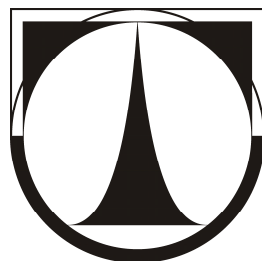


TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

FAKULTA STROJNÍ

KATEDRA MATERIÁLU



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Diamantový elektroforetický mikročip chlazený
Peltierovým článkem**

**The diamond electrophoretic microchip cooled with
Peltier device**



FAKULTA STROJNÍ

STUDIJNÍ PROGRAM: P 2301 STROJNÍ INŽENÝSTVÍ

STUDIJNÍ OBOR: 3911V011 MATERIÁLOVÉ INŽENÝRSTVÍ

**Diamantový elektroforetický mikročip chlazený
Peltierovým článkem**

ŘEŠITEL: Ing. Mateusz Fijałkowski
ŠKOLITEL: prof. dr hab. Stanisław Mitura
KONZULTANT: dr inž. Anna Karczemska

Rozsah práce

Počet stran: 155

Počet obrázku: 95

Počet tabulek: 11



Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL, v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Prohlašuji, že disertační práci na téma “Diamantový elektroforetický mikročip chlazený Peltierovým článkem“ jsem vypracoval samostatně. Použitou literaturu a podkladový materiál uvádím v přiloženém seznamu literatury.

V Liberci dne

.....

podpis



Poděkování:

Významné poděkování za péči a cenné rady patří dr inž. Anně Karczemské, koordinátorce evropského projektu “Diamond Microfluidic Devices for Genomics and Proteomics”, v rámci kterého byla práce částečně realizována.

Mému školiteli, profesorovi Stanislavovi Miturovi, skládám poděkování za vědeckou pomoc v průběhu realizace práce, trpělivost při zpracování a také umožnění realizací části doktorského studia na zahraniční univerzitě.

Dále děkuji rodině, přátelům a všem známým, kteří mne motivovali do neustálé práce.

Disertační práce byla realizovaná v rámci mezinárodní dohody uzavřené mezi Technickou univerzitou v Liberci a Politechniką Łódzką v Polsku.

**Anotace**

Cílem disertační práce bylo vytvoření mikroprůtokového zařízení z materiálu o vysoké tepelné vodivosti a také zkoumání možností využití Peltierovy soustavy k chlazení, v průběhu elektroforetického procesu provedeného na diamantovém mikročipu. V rámci této práce, pomocí metody repliky byl vyroben diamantový elektroforetický mikročip. Tato metoda byla založena na výrobě křemíkové matrice o určené geometrii a následné depozici diamantové vrstvy. Polykrytalická diamantová vrstva o tloušťce přibližně 300 mikrometrů byla vyrobená pomocí techniky MPCVD (Micro Wave Plasma Chemical Vapour Deposition). Získaný diamantový mikročip byl charakterizovaný z hlediska: geometrických rozměrů a morfologie povrchu, fyzikálně – chemických vlastností, fázového složení, tepelných a optických vlastností. Pro takto vyrobený mikročip byla navržena a vyrobena měřicí soustava, která byla založena na Peltierově článku a umožňovala kontrolu teploty v průběhu elektroforézy. Pomocí termovizních kamer byla provedena tepelná charakteristika a určen vliv chlazení na Jouleovo teplo vznikající při elektroforetické separaci.

Klíčová slova: diamant, elektroforetický mikročip, metoda repliky, elektroforéza, MPCVD,

Abstract

The aim of this study was to manufacture microfluidic device from a material of high thermal conductivity and also to investigate the possibility of using Peltier system for cooling during the electrophoretic process carried out on the diamond microchip. In this work, the replica method was used for fabrication of diamond electrophoretic microchip. This method was based on the production of silicon mould with the geometry and the subsequent deposition of diamond layer. Polycrystalline diamond layer with a thickness of approximately 300 microns have been made by MPCVD technique (Micro Wave Plasma Chemical Vapour Deposition). The obtained diamond microchip was characterized with regard to: geometric dimensions and surface morphology, physico-chemical properties, phase composition, thermal and optical properties. For this microchip was designed and constructed a measuring system which was based on the Peltier element to allow for temperature control during electrophoresis. Thermal imaging cameras were used for thermal characteristics and to determine the influence of generated Joule heat on the electrophoretic separation.

Key words: diamond, electrophoretic microchip, replica method, electrophoresis, MPCVD,

**OBSAH**

Seznam zkratk a symbolů	8
1. Úvod	9
2. Přehled literatury	11
2.1 Mikročipová elektroforéza	11
2.1.1 Mikročipy	13
2.1.1.1 Metodika výzkumu	13
2.1.1.2 Zavedení vzorku	15
2.1.1.3 Geometrie mikrokanálů	17
2.1.1.4 Detekce	20
2.1.1.5 Jouleova teplo	22
2.1.2 Použití mikročipové elektroforézy	25
2.1.2.1 Sekvencování DNA	25
2.1.2.2 Genetická analýza	27
2.1.2.3 Imunologické testy	30
2.1.2.4 Bílkoviny a peptidy	33
2.2 Materiály používané na výrobu mikročipů	36
2.3 Techniky výroby	37
2.4 Shrnutí přehledu literatury	44
3. Cíl a teze práce	45
4. Vlastní výzkum	46
4.1 Počítačové modelování	46
4.2 Technologie vytvoření diamantového elektroforetického čipu	50
4.2.1 Vypracování a vyrobení prototypu křemíkové matrice	50
4.2.2 Vytvoření polykrystalického diamantového čipu	55
4.2.3 Navržení a vyrobení prototypového krytu struktury čipu	57
4.3 Základní konstrukční požadavky měřící soustavy	59
4.4 Metodika zkoumání získané mikrostruktury	60
4.4.1 Zkoumání geometrie mikrostruktury a morfologie povrchu	60
4.4.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie SEM	60
4.4.1.2 Konfokální mikroskopie	60
4.4.2 Analýza fyzikálně-chemických a mechanických vlastností	61
4.4.2.1 Fotoelektronová Spektroskopie XPS	61
4.4.2.2 Rentgenová mikroanalýza EDX	62
4.4.2.3 Smáčivost povrchu	62



4.4.2.4 Volná povrchová energie.....	63
4.4.2.5 Tvrdost a Youngův modul pružnosti.....	64
4.4.3 Analýza fázového složení.....	65
4.4.3.1 Ramanova spektroskopie.....	65
4.4.3.2 Rentgenová difrakce XRD.....	66
4.4.4 Analýza tepelných vlastností.....	66
4.4.5 Analýza optických vlastností - spektrofotometrie UV-VIS-IR.....	67
4.4.6 Měření rozložení teploty v diamantovém mikročipu.....	68
5. Výsledky zkoumání.....	71
5.1 Měřicí soustava k provádění elektroforetických rozvodů.....	71
5.2 Výsledky studia mikrostruktury a morfologie povrchu.....	75
5.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie SEM.....	75
5.2.2 Konfokální mikroskopie.....	78
5.3 Výsledky fyzikálně – chemických a mechanických zkoumání.....	82
5.3.1 Fotoelektronová spektroskopie XPS.....	82
5.3.2 Rentgenová mikroanalýza EDX.....	85
5.3.3 Smáčivost povrchu.....	87
5.3.4 Volná povrchová energie.....	88
5.3.5 Tvrdost a Youngův modul pružnosti.....	89
5.4 Výsledky zkoumání fázového složení.....	90
5.4.1 Ramanova spektroskopie.....	90
5.4.2 Rentgenová difrakce XRD.....	90
5.5 Výsledky zkoumání tepelných vlastností.....	91
5.6 Výsledky zkoumání optických vlastností.....	93
5.7 Výsledky měření rozložení teploty provedené termovizní kamerou.....	94
6. Diskuze výsledků.....	104
7. Závěry.....	110
8. Literatura.....	111
9. Seznam obrázků a tabulek.....	120
10. Přílohy.....	123

**Seznam zkratek a symbolů**

Označení symbol	Popis
μDiaGene	Microdiagene: nucleic acid sequencing in a diamond-silicon chip – název projektu
MCE	Mikročipová kapilární elektroforéza (<i>z ang. Mikrochip Capillary Electrophoresis</i>)
CGE	Kapilární gelová elektroforéza (<i>z ang. Capillary Gel Electrophoresis</i>)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (<i>z ang. Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)
ESI	Ionizace pomocí rozprašování v elektrickém poli (<i>z ang. Electrospray Ionization</i>)
LIF	Metoda laserové indukční fluorescence (<i>z ang. Laser Induced Fluorescence</i>)
CVD	Chemická depozice z plynné fáze (<i>z ang. Chemical Vapour Deposition</i>)
MP CVD	Metoda chemické depozice z plynné fáze s použitím plazmy buzené mikrovlnami (<i>z ang. Microwave Plasma Chemical Vapour Deposition</i>)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan) (<i>z ang. polydimethylsiloxane</i>)
PEEK	Polyetheretherketon Polyeteroeteroketon
VLSI	VLSI (<i>z ang. Very Large Scale Integration</i>)
CMOS	CMOS (<i>z ang. Complementary Metal Oxide Semiconductor</i>)
SEM	Skenovací/rastrovací elektronový mikroskop (<i>z ang. Scanning Electron Microscopy</i>)
SE	Sekundární elektrony (<i>z ang. Secondary Electrons</i>)
BSE	Zpětně odražené elektrony (<i>z ang. Backscattered electrons</i>)
ESED	(<i>z ang. Enviromental Secondary Electron Detector</i>)
EDX	Energiově disperzní rentgenová analýza (<i>z ang. Energy Dispersive X-ray Analysis</i>)
CLSM	Skenovací konfokální laserový mikroskop (<i>z ang. Confocal Laser Scanning Mikroskopy</i>)
SGP	Geometrická struktura povrchu
Ra	Průměrná aritmetická odchylka
Rz	Maximální výška profilu drsnosti
Rt	Celková výška profilu drsnosti
XPS	Fotoelektronová spektroskopie (<i>z ang. X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)
EELS	Spektroskopie charakteristických energetických ztrát elektronů (<i>z ang. Electron Energy Loss Spectroscopy</i>)
FWHM	Šířka v polovině maxima (<i>z ang. Full Width at Half Maximum</i>)
SEP	Volná povrchová energie
XRD	Rentgenová difrakce (<i>z ang. X-ray Diffraction</i>)
ICDD	Krystalografická databáze (<i>z ang. International Centre for Diffraction Data</i>)
LFA	Pulsní laserová metoda (<i>ang. Laser Flash Analyzer</i>)
LWIR	Dlouhé infračervené vlnové délky (<i>z ang. Long-wavelength infrared</i>)
MWIR	Střední infračervené vlnové délky (<i>z ang. Mid-Wavelength Infrared</i>)
PID	Regulátor složený z proporcionální, integrační a derivační části (<i>z ang. proportional-integral-derivative controller</i>)



1. Úvod

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících vývoj biomedicínského inženýrství je rychlé, levné a přesné označování zkoumaných látek. Pro splnění těchto požadavků vznikly moderní sekvencery – přístroje pro dělení částí DNA, které na základě elektroforetických rozvodů uskutečňují analýzu jednotlivých složek vzorků. Elektroforéza je proces, ve kterém pod vlivem přivedeného elektrického pole dochází k pohybu pohyb makročástic, jež jsou vyznačující se nevyváženým elektrickým nábojem [1]. Miniaturizace této techniky, díky použití mikročipových zařízení, významně zrychlila vývoj tohoto odvětví vědy. Nemalý počet výzkumných center neustále vyvíjí moderní konstrukce, které jsou stále častěji využívány v nových aplikacích, a také zaručují maximální efektivitu provedených analýz. Mnohdy je toho dosaženo integrací mikrostruktur s nejnovějšími elektronickými součástkami. Hlavními vlastnostmi, kterými by se měla charakterizovat taková zařízení, jsou opakovatelnost, rychlost sekvencování, vysoké rozlišení a účinnost.

Hlavním problémem, který je třeba brát v úvahu při elektroforéze, a to jak klasické tak mikročipové, je generované Jouleovo teplo. To způsobuje několik nepříznivých jevů probíhajících přímo v pufru nebo gelu, ve kterém je veden proces elektroforézy. Toto teplo musí být efektivním způsobem odvedené. Vyrobení mikročipů z materiálů o vysoké tepelné vodivosti a vytvoření mikrokanálů o obdélníkových průřezích, umožňuje efektivní odvod tepla. Taková funkční konstrukce zařízení (volba materiálu a geometrie kanálů), a také způsob vytvoření diamantového elektroforetického mikročipu, byl zpracovaný dr. ing. Annou Karczemskou z Politechniki Łódzkiej, která byla koordinátorem projektu „Diamantové mikroprůtokové zařízení pro proteomiku a genomiku” (DIAMID). Projekt vyrobení takového zařízení byl zrealizován týmem dr. doc. Jana Łysko z ITE, dr. Johna Hassarda z Imperial College a také dr. Victora Ralchenko z Ruské Akademie Věd v Moskvě. Poprvé se myšlenka takového zařízení objevila v roce 1996 na Imperial College v Londýně, v „diamantové skupině“ vedené dr. Johnem Hassardem [2], kde probíhalo doktorské studium Anny Karczemské. Výsledkem toho byl projekt μ DiaGene, který se zabýval touto problematikou, ale nakonec byl založen na využití jiných materiálů. V té době se ještě nepodařilo získat požadovanou geometrii mikrostruktur z diamantu, kvůli různým technologickým problémům. Proto v letech 2007 – 2010 vznikl projekt DIAMID, na kterém se autor této práce podílel, a který byl úspěšně uzavřen. Výsledkem tohoto projektu bylo vytvoření mikročipů z diamantu k elektroforetickému použití, vyznačujícím se odpovídající geometrií mikrokanálů a vysokým součinitelem tepelné vodivosti.



Autor této práce navrhl jako řešení výše uvedeného problému, široce popsaného v literatuře, výrobu mikrostruktury z materiálu s nejvyšším možným součinitelem tepelné vodivosti. Toto řešení poskytne rychlý přenos tepla generovaného v mikrokanálech do objemu mikročipu. Pro účinné odvedení tepla z mikročipu, autor této práce navrhl použití Peltierova článku, jako součásti zajišťující okamžité odvedení tepla. Řešení by mělo být účinným způsobem jak odvést teplo a tím kompenzovat teplotní gradienty jak podél mikrokanálů, tak v jejich průřezích. Díky tomu je možné aplikovat vyšší napětí v průběhu elektroforézy provedené v mikročipu. Použití tohoto způsobu řešení umožní významné snížení testovacího času, zvýšení rozlišení měření, a také díky chemické odolnosti materiálu čipu rozšíří možnosti testování zkoumaných látek.

V této práci byla vyrobena nová generace zařízení sloužícího k provedení mikročipové elektroforézy. Autorem uvedené řešení spočívá ve výrobě určené geometrie mikrokanálů z materiálu o vysoké tepelné vodivosti ve spojení s Peltierovým článkem poté sloužícím k účinnému odvádění Jouleova tepla v průběhu elektroforetické separace. Prezentované řešení nebylo dosud popsáno v literatuře a umožňuje redukci nežádoucího Jouleova tepla, vznikajícího během procesů elektroforézy.

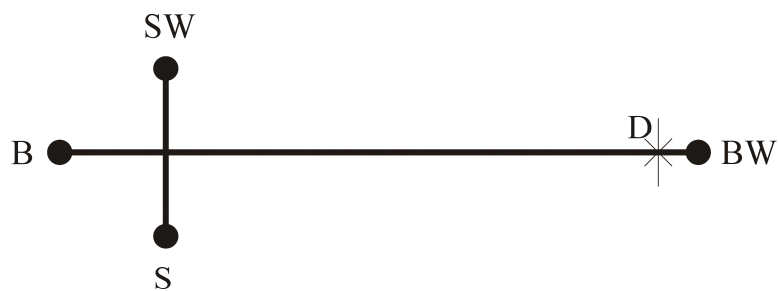
V této práci byla využita nová technologie, pomocí které byla vyrobena mikrostruktura z diamantu, který je materiálem velmi obtížně tváritelným. Těsného spojení krytu mikročipu bylo dosaženo pomocí spojovací techniky s využitím PDMS jako pojiva. Následovalo vytvoření měřicí soustavy vybavené vysokonapětovým zdrojem, sloužícím k vedení mikročipové elektroforézy se současným chlazením pomocí Peltierova článku. Rovněž byla provedena kompletní charakteristika vyrobeného diamantového mikročipu s cílem určení a verifikace jeho užitných vlastností. Studie v rámci této práce zkoumaly možnosti odvedení Jouleova tepla z mikrostruktury, za pomoci tepelného rozložení na povrchu krytu. Tyto studie byly prováděny pomocí termovizních kamer.

2. Přehled literatury

2.1 Mikročipová elektroforéza

První zmínka v literatuře na téma výroby analytických mikročipových systémů, byla prezentována v roce 1979 na Stanfordské univerzitě v USA. Vědci vytvořili křemíkový mikročip pro plynovou chromatografii. Provedené experimenty byly finančně náročné, ale dokázaly možnosti miniaturizace analytických metod [3].

První miniaturní systém k mikročipové elektroforéze, byl uskutečněn Manzem a jeho kolektivem [4] v roce 1992. Tento objev zahájil velký průlom v oblasti moderní, rychlé a účinné separace biomolekul. O rok později, v rámci Harrisonova výzkumného týmu [5], byl předložen skleněný elektroforetický čip, ve kterém došlo k oddělení směsí dvou barviv fluoresceinu a kalceinu. V roce 1995 použili Wooley a Mathies [6] jako první, čip pro analýzu DNA. V současné době je metoda elektroforetických separací nejčastěji používanou technikou pro stanovení složení analytů. Produkované mikročipy mají řadu vylepšení, jejichž počet se stále zvyšuje. Mikročip je destičkou o malých rozměrech s vyrobenou sítí mikrokanálů a mikrozásobníků na povrchu, o tvaru, který je závislý na použití. Tato struktura je utěsněna připojeným krytem ze stejného nebo jiného materiálu. Nejjednodušší geometrie elektroforetického čipu pro vedení mikročipové elektroforézy má tvar kříže (T – injektor), který se skládá z hlavního kanálu a kanálu pro přívod a dávkování separované látky. Na obrázku 1 je uvedeno schéma geometrie mikročipu s označenými mikrozásobníky.



Obr. 1 Schéma geometrie elektroforetického mikročipu, S – zásobník se vzorkem, SW – zásobník odpadů vzorku, B – zásobník pufru, BW – zásobník odpadů pufru, D – bod detekce

Elektroforetická separace probíhající na tomto zařízení se skládá z několika etap. V první fázi je nutné zvolit vhodný roztok pufru pro rozdělování látky a také zajistit homogenní vyplnění mikrostruktury čipu puftrem. Ve druhém kroku se přivádí vzorek analyzovaného materiálu a provede se elektroforetické oddělení látek v hlavním kanálu. Posledním krokem je detekce rozdělené látky, která se obvykle provádí na konci kanálu v místě označené písmenem D.

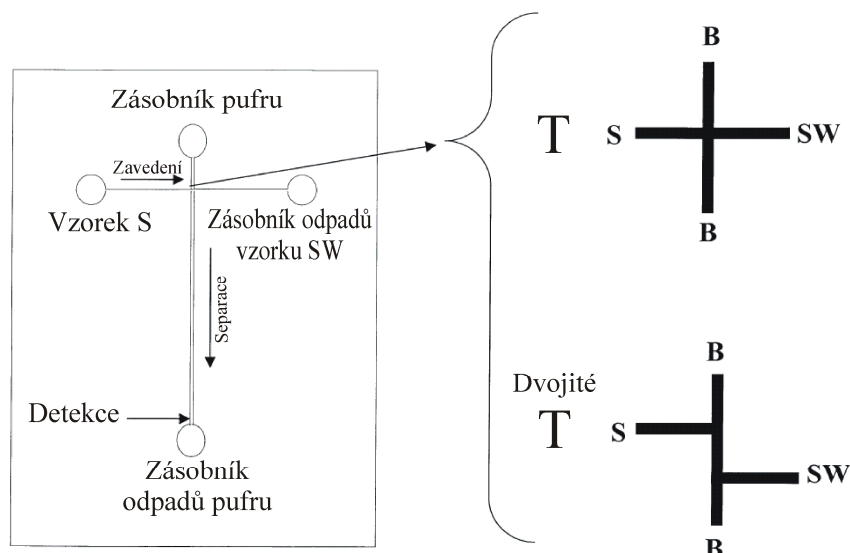
Dalším termínem spojeným s mikročipy je μ – TAS (micro – Total Analysis System), neboli komplexní systém obsahující všechny elementy potřebné k provádění analýz včetně zdroje, připravení vzorků a také mechanismu detekce. Technologie mikroobrábění umožňuje výrobu takřka libovolných tvarů přizpůsobených pro konkrétní účely. Vícekanálové zařízení umožňují například počáteční míchání zkoumaných analytů před jejich rozdělením. Snížené rozměry zařízení zlepšují separační účinnost a snižují dobu testování v porovnání s běžnými technikami. Využitím mikročipové elektroforézy lze použít vysoké intenzity elektrického pole pro oddělení látek, což zvyšuje jeho účinnost. Elektrokinetický průtok v těchto zařízeních eliminuje nutnost použití ventilů a pump, které je obtížné minimalizovat. V současné době se systémy μ - TAS zabývá mnoho výzkumných center, které se shodly, že využití těchto systémů je stále nepřeborné. Každý výzkumný pracovník, pohybující se v této oblasti, zdůrazňuje obrovský potenciál těchto zařízení v sekvencování DNA, vyhledávání chorob v časných stádiích (*ang. screening*), testování léčiv a analýz proteomu [7]. Elektroforéza prováděná pomocí mikročipů je výkonnější proto, že odvádění tepla ve formě čipu je efektivnější ve srovnání například s kapilárou ze stejného materiálu. Současné články v literatuře ukazují použití speciálních materiálů pro mikročipy, které zajišťují efektivní odvod generovaného tepla [8]. Doba potřebná pro zkoumání vzorků je mnohem kratší, což je hlavní výhodou těchto zařízení. Využívání mikročipů umožňuje minimalizovat spotřebu zkoumaných vzorků a chemických činidel. Většina prací, publikovaných v předmětu rozdělování látek pomocí mikrofluidních zařízení, je postavena na základě techniky elektroforézy, nikoliv na chromatografii. Elektroforéza využívající mikročipovou techniku je přímější a pohodlnější z několika důvodů. Za prvé, hnací silou elektroforézy je elektroforetické pole, které je přivedeno kontaktem elektrod s vodivým pufrům, bez použití vysokého tlaku nutného v chromatografii. Za druhé, v některých elektroforetických metodách, jako je zónová kapilární elektroforéza (CZE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a izoelektrické fokusace (IEF), je separační účinnost určena především napětím. Proto může být mikročipová elektroforéza provedena s vysokou účinností pod vlivem aplikovaného vysokého elektrického pole ve značně kratším kanálu, zatímco chromatografickou účinnost lze zvýšit pouze zvýšením délky kapiláry. Za třetí, samotné pufrы nebo pufrы v kombinaci s některými přísadami jsou dostačující pro elektroforetické separace, na rozdíl od stacionární fáze monolitického materiálu v chromatografii. Existuje mnoho různých modifikujících přísad pufrů, které splňují požadavky elektroforézy prováděné v různých režimech. Jsou to hlavně polymery rozpustné ve vodě používající se v kapilární gelové

elektroforéze (CGE), amfolity pro izoelektrické fokusace (IEF) a surfaktanty pro micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Celkově všechna tato zjednodušení v práci MCE snižují náklady na zkoumání pomocí čipu a přispívají k miniaturizaci a přenositelnosti zařízení. Vývoj moderních technologií je podstatný k pokroku v oblasti elektroforetických mikročipových separací. Fotolitografie a související technologie MEMS (Micro Electro Mechanical Systems), používané k výrobě mikročipů a součástí, poskytují spoustu moderních prvků pro průběh mikročipové elektroforézy. Mikročipy mají obrovskou výhodu ve srovnání s kapilární elektroforézou, protože je možné vytvořit libovolnou kombinaci mikrokanálů a přidat nové součásti na rozdíl od kapilární elektroforézy, kde žádná taková možnost neexistuje. Biologické vzorky mohou být kontrolovaným způsobem injektovány, předběžně přidávány, aplikovány kontinuálním způsobem nebo také přerušovány mícháním s jinými vzorky. Pufry mohou být přidávány nebo směřovány současně nebo jeden po druhém v libovolném místě a čase. Jiné techniky založené na mikrofluidních čípech poskytují značné přínosy v elektroforetických separacích: uplatnění mikroohřevu k provedení reakce a separace, pneumatické ventily umožňují flexibilní třídění a injekci určených látek, mikropumpy mohou vést a míchat vzorky přes různé oblasti čipové mikrostruktury. Kromě toho aplikace fluorescence, elektrochemické detekce a miniaturizace hmotnostní spektrometrie umožňují integrace těchto zařízení [9].

2.1.1 Mikročipy

2.1.1.1 Metodika výzkumu

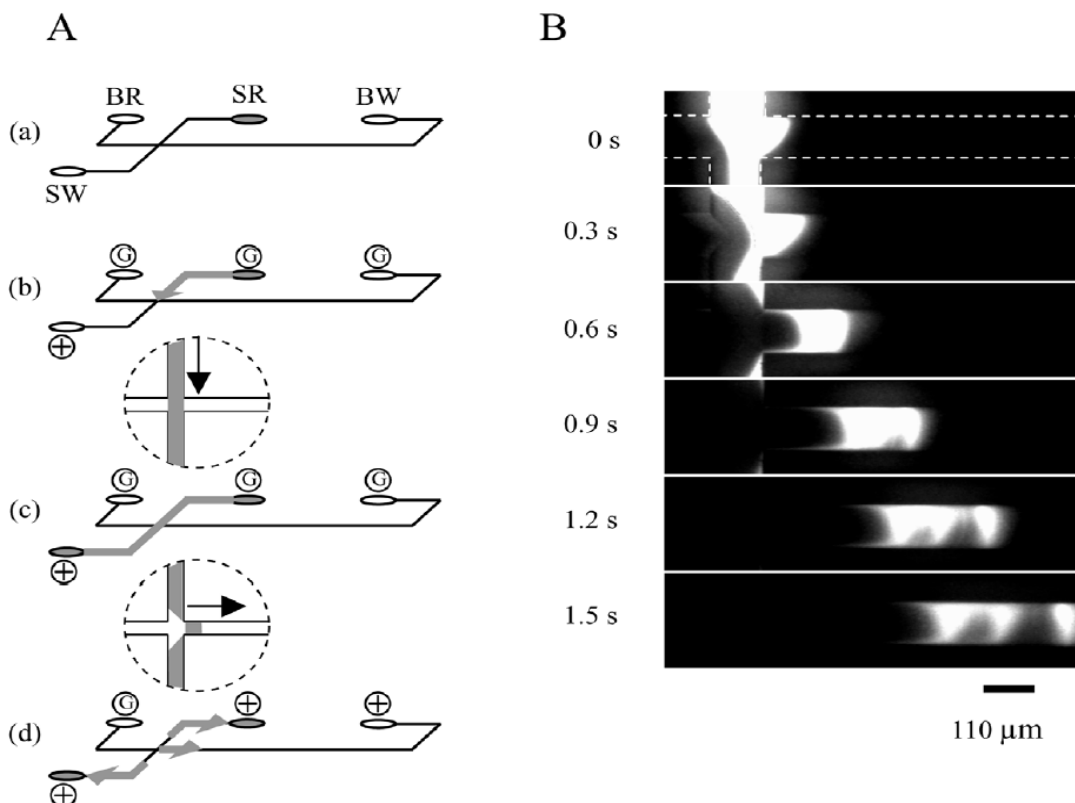
Schéma typického mikročipového zařízení je znázorněno na obrázku 2. Základní metodou sloužící k zavedení vzorků do separačních kanálů je T – injekce a dvojité T – injekce. Velikosti vyráběných prostých mikrokanálů pro tato zařízení se pohybují v rozmezí od 10 do 100 μm (šířka) a od 3 do 10 cm (délka). Za účelem snížení plochy čipu se používá také spirální serpentinový tvar, který zaručuje omezení velikosti čipu. Culbertson a kolektiv [10], ve své práci předvedli čip s geometrií kanálu ve tvaru polokoule s umístěným 25-ti centimetrovým kanálem při zachování celkového rozměru mikročipu. V základní konfiguraci, uvedené na obrázku 2, jsou kanály vyplněny pufrem. Navíc roztok pufru je zavedený do zásobníků B a do zásobníku odpadu vzorku SW. Analyzovaný vzorek se nachází v zásobníku S.



Obr. 2 Schéma mikročipu s jednotlivými kanály. Ve zvětšení jsou zobrazeny systémy zavedení zkoumaných vzorků ve tvaru T – injektoru a dvojitého T – injektoru [10]

V průběhu procesu elektroforézy, stejně jako v případě kapilární elektroforézy, je generován elektroosmotický průtok EOF mezi stěnami kanálu hlavně vzhledem k přítomnosti volných silanových skupin. Separační napětí používaná v čipové elektroforéze se pohybují v rozmezí od 2 do 30 kV a jsou poskytována prostřednictvím speciálních vysokonapěťových zdrojů, nejčastěji spojených s platinovými elektrodami umístěnými přímo v zásobnících. Během vedení mikročipové elektroforézy v separačním kanálu je jako standardní řešení používáno dodatečné napětí přivedené do zásobníku, které zpravidla není zapojené do separace. Přivedené napětí do zásobníku vzorku S a odpadu SW se současným uzemněním zásobníku pufru umožňuje zabránění úniku výtoku z dávkovacího kanálu do separačního během elektroforézy. Tento jev je nežádoucí, protože významným způsobem snižuje rozlišení metody [11].

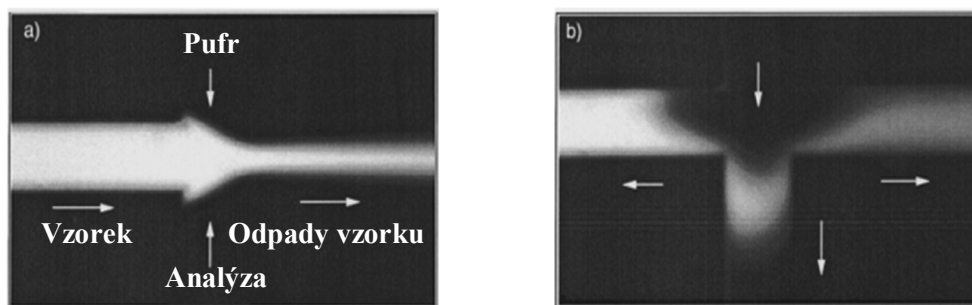
Nagata a kolektiv [11] uvedli ve své práci podrobnou metodiku provedení elektroforetické separace bílkovin pomocí křemenného čipu uvedeného na obrázku 3. K zavedení vzorku použili například napětí 350 V přivedené do zásobníku se vzorkem s paralelním uzemněním ostatních zásobníků. Při elektroforetické separaci analyzovaných proteinů bylo použito napětí 1200 V přivedené do zásobníku BW a napětí 540 V do zásobníků SW a SR se současným uzemněním zásobníku BR. Autoři po pokročilém zkoumání aplikací různých napětí zjistili, že se zvyšujícím se napětím roste separační rychlost, což způsobuje pokles rozlišení.



Obr. 3 Křemenný mikročip pro separace bílkovin, (A) Schéma zavedení vzorku a jednotlivé postupy separace, SR – zásobník se vzorkem, SW – zásobník odpadů vzorku, BW – zásobník s pufrům, SW – zásobník odpadů pufru (B) Fluorescenční snímky z jednotlivých fází zavedení vzorku [11]

2.1.1.2 Zavedení vzorku

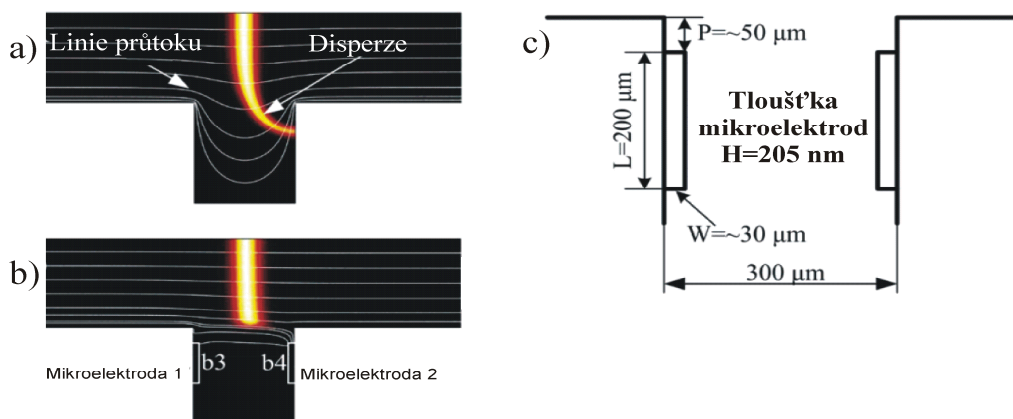
Používání mikročipů nabízí nové možnosti pro zavádění vzorků v oblasti jejich separace. Prostřednictvím využití složitých geometrií lze dosáhnout snadnějšího ovládání profilu a složení oddělovaných analytů. Zavedení zkoušené látky do mikrokanálu je prvním krokem v mikročipové elektroforéze. Nejběžnějším způsobem zavedení vzorku je elektrokinetická metoda, založená na průtoku pod vlivem elektrického pole [12,13]. Skládá se ze dvou fází, a to zavedení a dávkování. V typickém uspořádání příčného mikročipu (T – injekce) je v první fázi vzorek zaveden do příčného kanálu přivedením elektrické pole a následně, po přivedení napětí do hlavního kanálu, probíhá podél něho elektroforetická separace. Způsob vyplňování mikrokanálů oddělovanou látkou je znázorněn na obrázku 4.



Obr. 4 Způsob vyplňování mikrokanálu: a) zavedení vzorku do hlavního kanálu, b) dávkování vzorku [12]

Během elektrokinetického vyplňování separačního kanálu je třeba věnovat pozornost dvěma aspektům. Prvním z nich je disperze vzorku v separačním kanálu v průběhu průtoku. Druhým velice důležitým problémem je únik výtoku zkoumaného vzorku ze zaváděcího kanálu do separačního v průběhu procesu elektroforézy. Tyto jevy výrazně oslabují rozlišení metody.

Cui a jeho kolektiv [14] vyvinuli techniku zamezení jevu úniku výtoku vzorku ze zaváděcího do separačního kanálu v průběhu mikročipové elektroforézy. Mikroelektrody, vyrobené na vstupu do separačního kanálu, vytvořily blokující ventil pracující na základě elektrického pole, který umožnil přesnou kontrolu množství a času dávkování vzorku. Toto řešení dovolilo zavedení vzorků do separačního kanálu o konstantních objemech. Tím však došlo k celkové eliminaci výtoku vzorku do hlavního kanálu během separace. Na obrázku 5 je uvedeno navržené schéma řešení.



Obr. 5 Použití elektrického pole k eliminaci jevu disperze v průběhu elektroforézy: a) profil průtoku bez použití ventilu, b) profil průtoku s použitím ventilu c) schéma umístění mikroelektrod v mikročipu [14]

Zhang i Manz [15] prezentovali mikročip se systémem jednoduchých injekcí zkoumaných vzorků do separačního kanálu. Tito vědci zjistili, že miniaturizace zaváděcího kanálu ve významné míře ovlivňuje nepříznivý jev výtoku zkoumaného vzorku. Nevýhodou tohoto

řešení je problém s realizací kanálů o malých rozměrech. Tsai a jeho kolektiv [16] předložili důkaz omezení výtoky ze zaváděcího kanálu. V rámci výzkumu vytvořili kanály pro zavedení vzorku, které byly umístěny pod úhlem 30° do separačního kanálu.

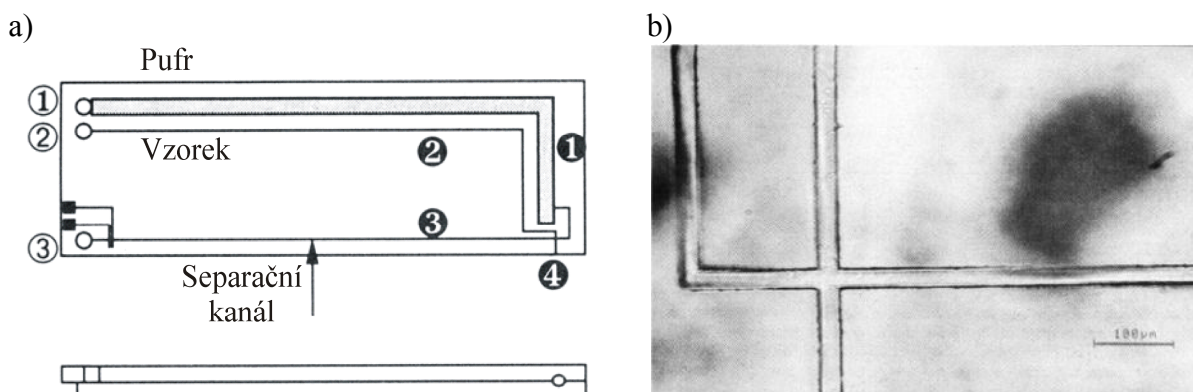
Dalším řešením umožňujícím vstřikování vzorků pomocí tlaku, je metoda navržená Luo a jeho kolektivem [17]. Ve své práci uvádějí pozitivní výsledky zavedení vzorků pomocí hydrostatického tlaku. Tato metoda prokázala svou účinnost v oddělování jednotlivých buněk. Použití tlakových technik pro zavedení vzorku snížilo počet požadovaných elektrod, nutných zejména ve vícekanálových mikročipových systémech. Zhang a jeho kolektiv [18] ve své práci použili podtlak k zavedení vzorků do mikrokanálů.

Mikropumpy a mikroventily jsou také využívány k zavedení a injekci zkoumaných vzorků. Karlinsey a jeho kolektiv [19] navrhl skleněno - polymerový (PDMS) mikročip, který využíval membránové integrované pumpy. Tento systém byl využit k extrakci DNA a také k rychlé detekci genů a bakterií.

2.1.1.3 Geometrie mikrokanálů

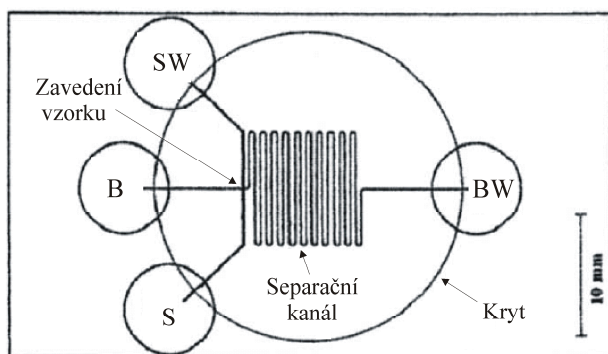
Možnost výroby libovolné geometrie, a také spojování kanálů v definovaný tvar systému, je jednou z nejdůležitějších a nejužitečnějších vlastností mikročipové elektroforézy. Její složitost je závislá na předpokládaném použití a výkonnosti zařízení.

První mikrokanálová geometrie byla navržena Manzem a jeho kolektivem [4]. Vědci vyrobili jednoduchý kanál na destičce ze skla o rozměrech 14,8 x 3,9 x 1 cm. Obrázek 6 ukazuje vyrobenou strukturu.



Obr. 6 Elektroforetický mikročip a) schéma kanálů na skleněném substrátu, b) obraz ukazující spojení 4 kanálů o šířce 30 μm [4]

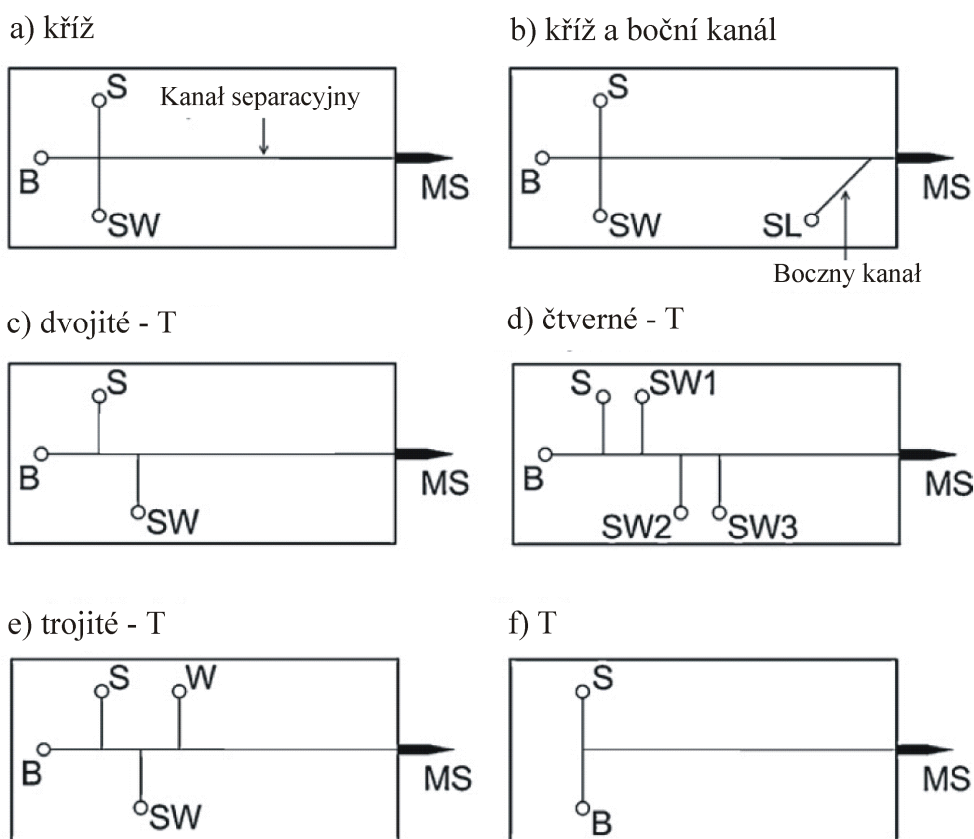
Dalším příkladem miniaturizace systému je mikročip vyrobený na skleněném povrchu metodou fotolitografie, s kanálem ve tvaru serpentine o délce 165 mm, který byl umístěn na destičce o velikosti menší než 10 x 10 mm [20].



Obr. 7 Elektroforetický mikročip se serpentinovou geometrií hlavního kanálu, *S* – vzorek, *B* – pufr, *SW* – zásobník odpadu vzorku, *BW* – zásobník odpadů pufru [20]

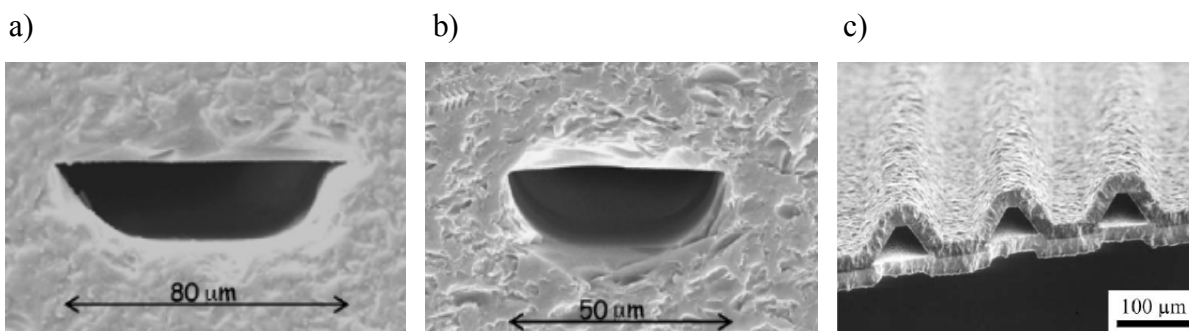
Za účelem dosažení vysoce produktivní separace se navrhuje řešení vícekanálových zařízení s rozšířenými systémy zavedení vzorků. Vyplynulo to z nutnosti zvýšení výkonnosti čipů pro testování DNA. Emrich a jeho kolektiv [21] představili skleněný čip obsahující 384 kanálů, integrovaný v jedné destičce o průměru 200 mm. Ve svých studiích prokázali možnost současného provedení 384 analýz v čase kratším než 7 minut.

Na obrázku 8 jsou uvedeny příklady tvarů mikrostruktur pro mikročipovou elektroforézu využívající hmotnostní spektrometrii MCE – MS jako detekční techniky.



Obr. 8 Geometrie mikrokanálů pro mikročipovou elektroforézu s detekcí pomocí hmotnosti spektrometrie, *MS* – hmotnostní spektrometr, *S* – vzorek, *B* – pufr, *SW* – zásobník odpadů vzorku, *SL* – tekutina podporující ionizaci, *W* – tekutina pro propláchnutí [22-27]

Při použití tohoto druhu detektoru je nejčastěji používanou geometrií křížový kanál T – injekce (obrázek 8a) [22]. Do křížového čipu je vzorek obvykle vstřikován, což působí na zvětšení výkonnosti nebo může být do čipu zaveden pomocí selektivního průtoku skrz mikrokanál. Tato metoda umožňuje přívod vzorků o požadovaném objemu s možností ovládání času nastřikování, který je závislý na hodnotě aplikovaného napětí. Dalším řešením znázorněným na obrázku 8b [23] je používání doplňkového bočního kanálu spojeného se zásobníkem umístěným na vstupu do spektrometru. Pomocí speciální techniky k detekci MS v kombinaci s ESI (ionizace elektrosprejem), je nutné stabilizovat proces ionizace, který je realizován zředěním oddělovaných analytů. Mezi mnoho geometrií založených na T – injekci se vyskytují také systémy dvojité T – injekce. Schéma takového zařízení je uvedeno na obrázku 8c [24]. Použití tohoto konstrukčního řešení zajišťuje zachování stejného množství vstřikovaného vzorku do separačního kanálu. Některé z analytů jsou připravovány ke zkoumání ve zředěné formě. Z toho důvodu, při jejich oddělování pomocí mikročipové elektroforézy, následuje nutnost použití čtverných T – injektorů pro počáteční zvýšení hustoty vzorku. Schéma takového zařízení je uvedeno na obrázku 8d [25]. Dalším řešením je trojitý systém T – injekce se zavedením dalšího kanálu se zásobníkem sloužícím k propláchnutí mikrostruktury, který je uveden na obrázku 8e [26]. Mao a jeho kolektiv [27] vytvořil přímý kanál s jednoduchou T – injekcí znázorněný na obrázku 8f. Hmotnostní spektrometr propojili s mikrokanálem, což umožnilo velmi přesné určení rozlišení a analytické výkonnosti. Zavedení vzorku a elektroforetický proces byl vykonán přivedením napětí do zásobníku vzorku a pufru se současným uzemněním detektoru. Příčné průřezy mikrokanálů jsou do značné míry závislé na výrobní technice mikrostruktury a také aplikaci vyrobeného čipu. Pro mikročipové elektroforézy se v literatuře nejčastěji vyskytují mikrokanály ve tvaru oválných, lichoběžníkových a obdélníkových průřezů. Pozo-Ayuso a jeho kolektiv [28] uvedl ve své práci skleněný čip s vyrobenou mikrostrukturou pomocí fotolitografie a metod mokrého leptání. Struktura byla uzavřena krytem ze stejného materiálu prostřednictvím trvalého difuzního připevnění. Průřezy kanálů získaných autory jsou uvedeny na obrázcích 9 a i b. Bjorkman a jeho kolektiv [29] ve své práci představil lichoběžníkový tvar mikrokanálu vyrobený z polykrystalického diamantu pro použití v chromatografii. Toto zařízení bylo vyrobeno dvoustupňovým procesem repliky. Na obrázku 9 c je uveden příčný řez získané struktury lichoběžníku o geometrických rozměrech: dolní strana 73 μm , horní strana 13 μm a výška mikrostruktury 46 μm .



Obr. 9 SEM snímky příčných řezů mikrokanálů: a), b) kanál o oválném tvaru vyrobený ze sodno-vápenného skla [28], c) kanál o lichoběžníkovém tvaru vyrobený z polykrytalického diamantu [29]

2.1.1.4 Detekce

Detektory pro mikročipovou kapilární elektroforézu jsou důležitým prvkem tohoto zařízení rozhodujícím o jeho významnosti a také získávaných výsledcích analýz. Konečná volba detektoru závisí na aplikaci a požadovaných výsledcích zkoumání. U vysokorychlostních účinných řešení, jako například pro farmaceutiku nebo ve výzkumných laboratořích, není miniaturizace detektoru nutná. Nicméně, detektory musí postačovat k rychlosti separace probíhající v mikročipech mikročipů. Jestliže je čip schopen současně provádět 96 separací trvajících od několika sekund do několika minut, musí být detektor charakterizován vysokou účinností, která zajišťuje správnou registraci údajů z analýz. Pro řešení mobilních mikročipů, které mohou používat pacienti doma, je nutná miniaturizace detektorů.

Od chvíle, kdy rozměry mikročipu umožňují aplikace malého množství zkoumaných vzorků (řady pl), jsou nutné velmi citlivé techniky detekce. První prezentovaný systém pro kapilární elektroforézu MCE využíval fluorescence z hlediska možnosti fokusace laserového paprsku na malou část povrchu [30]. Laserem indukovaná fluorescence (LIF) je velmi citlivá a její použití nevyžaduje žádnou změnu v geometrii čipu. LIF detekce se ukázala velmi užitečnou v sekvenování DNA pomocí konfokálního systému, který je schopen detekovat čtyři různé barvy odpovídající čtyřem označovaným párům bází DNA [50]. Mikročipová LIF detekce je jednou s nejvíce rozšířených a nejpobulárnějších technik, ve kterých je použití fluoroforu ve většině případů nutné. Velikost laserů je téměř vždy větší než mikročipů, což znemožňuje použití této detekční techniky ve spojení s mikročipem v běžné domácnosti.

Použití techniky hmotnostní spektrometrie (MS) pro detekci analýz provedených na mikročipech, bylo poprvé popsáno v literatuře Lazarem a jeho kolektivem [31]. Představili ve

své práci elektrorozprašovač vyrobený ze skla a elastomeru PDMS. Zhang a jeho kolektiv [32] navrhl ve své práci dvě řešení pro zajištění elektrosprejování. První z nich používá kapilární přenos jako rozšíření separačního kanálu. Kapilární přenos byl zajištěn externím elektrosprejovým zdrojem, nicméně navrhovanou strukturu bylo těžkopádné realizovat. Druhé řešení bylo založeno na integraci pneumatického atomizéru a vyrobení kanálů pro přívod plynu do detektoru. Toto řešení nevyžaduje žádné externí komponenty a může sloužit jako jednorázový mikročip s detekcí MS. Nejnovější konstrukční řešení detektoru pro biomedicínské analýzy předložil Kitagawa a Otsuka [33]. Prezentovaná konstrukce detektorů MS ve spojení s elektrosprejováním (ESI) a ablační laserovou ionizací (LDI) se vyznačuje vysokou kvalitou rozlišení provedených analýz. Obecný princip této techniky je založen na odpařování kapky nacházející se mezi výstupem mikrokanálu a vstupem do hmotnostního spektrometru. Metody hmotnostní spektrometrie MS ESI umožňují relativně bezproblémovou analýzu roztoku díky možnosti ionizace za atmosférického tlaku. Zkoumané látky se odpaří a rozptýlí v atmosféře plynu použitím vysokého napětí v řádech několika kV.

Elektrochemická detekce (EC) je jednou z nejjednodušších metod pro miniaturizaci. Tato metoda je založena na redox reakci, ke které dochází na povrchu elektrody, a ne jak je tomu u jiných technik závislých na délce kanálu. Elektrody mohou být minimalizovány bez poklesu citlivosti. Standardní fotolitografické metody, které se používají při výrobě mikročipů, jsou také vhodné pro výrobu mikrometrových elektrod. Většina elektrod je vyráběna ze zlata, uhlíku a platiny. Hlavní překážkou při použití EC techniky pro detekci látek je problém s izolací elektrody s oblasti separace. Většina z navrhovaných konstrukčních řešení je realizována způsobem, kdy jsou elektrody namontovány na výstupu ze separačního kanálu. Tato skutečnost působí na ztrátu produktivity a zmenšuje citlivosti z důvodu ředění a ztráty spojené s průtokem. Moderní technologie mikroobrábění umožňuje vyrobení detektoru ve velmi malém měřítku, což dává možnost jejich využití pro sledování více kanálů současně. Touto technikou je možné selektivně detekovat analyty pomocí chemicky reverzibilní redoxní reakce [34]. Wang a jeho kolektiv [35] popsal ampérometrický detektor založený na metodě EC s elektrodami vyrobenými na povrchu mikrokanálů. Elektrody byly vyrobeny ze zlata naprášením ve výstupním mikrokanálu. Uvedené řešení bylo aplikováno na anodovou detekci neurotransmiterů. Zhao a jeho kolektiv [36] prezentoval ve své práci metodu konduktometrické změny vodivosti zkoumaného analytu. Pomocí této techniky se měří rozdíly mezi vodivostí označovaných částic a puffrového pozadí. Tato technika se běžně používá v laboratořích z důvodu možnosti použití pro analýzu prakticky všech látek, zejména



malých organických a anorganických iontů, které jsou obecně těžko zjištěitelné ampérometrickou metodou a mají nízkou absorpci pro optické měření. Další výhodou této techniky je, že zkoumání mohou být prováděna přímým kontaktem nebo bez kontaktu s elektrolytem založeným na bázi kapacitního měření elektrického pole.

2.1.1.5 Jouleova teplo

Hlavním omezením rychlosti, rozlišení a možnosti elektroforetické separace je schopnost odvedení Jouleova tepla vznikajícího v důsledku toku elektrického proudu elektroforetickým pufrům. Za prvé, toto teplo a výsledné teplotní gradienty mají negativní dopad na kvalitu separací. Pokud se vyskytnou teplotní rozdíly v pufru, a jsou poměrně vysoké, mohou indukovat teplotní gradienty v hustotách pufru, což může vést k přirozené konvekci. Taková konvekce může způsobit míchání separované oblasti vzorku, silně snižující účinnost separace. Za druhé, i když teplotní gradienty nejsou tak vysoké, aby způsobily přirozenou konvekci, tak se vyskytuje možnost snížení elektroforetické pohyblivosti μ v celém objemu pufru v důsledku teplotních rozdílů v profilu kanálu. Prostorová závislost elektroforetické pohyblivosti může způsobit deformaci migračních zón rozdělovaných vzorků, což vede k ovlivnění rozlišovací schopnosti metody. Za třetí, pokud se průměrná teplota pufru stává příliš vysokou, může se struktura analytů poškodit. Efektivní odvod tepla, a tím získání příznivých teplotních podmínek, je hlavním důvodem pro použití mikročipů v elektroforetických separacích [37]. Výkonnost elektroforetických separací ve značné míře závisí na hodnotě použitého napětí. Stejný vztah platí pro kapilární elektroforézu (CE), i pro mikročipy (MCE), ve kterých jsou vyrobené kanály mnohem kratší. Vyšší intenzita elektrického pole E způsobuje vzrůst proudu tekoucího mikrokanálem, který způsobuje vznik Jouleova tepla. Jeho hodnota Q je vypočtena podle vztahu:

$$Q = \rho \cdot E^2$$

kde: Q – Jouleovo teplo

E – elektrické pole

ρ – elektrická vodivost pufru

Existují tři hlavní aspekty pro vznik Jouleova tepla, které mají vliv na výkonnost mikročipové elektroforézy (MCE). Celkový nárůst teploty roztoku pufru vyplňující mikrokanály ΔT , vznik teplotního gradientu uvnitř mikrokanálu ΔT_x a nehomogenní rozložení teploty podél osy kanálu.



Pro výpočet průměrného tepla uvnitř mikrokanálu, v modelu elektroforetického mikročipu, lze aplikovat zjednodušený vztah použitý pro tenkostěnné kapiláry bez polyamidu (používané v kapilární elektroforéze CE) [38]:

$$T = T_0 + \frac{Q r_1^2}{2} \left[\frac{1}{k} \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{1}{r_2 h} \right] \quad (2)$$

kde: T_0 – teplota okolí

r_1 – vnitřní poloměr mikrokanálu

r_2 – vnější poloměr

k – tepelná vodivost stěny čipu

h – součinitel průchodu tepla (výkon záření na jednotku plochy na jednotku teploty, jedná se o rozdíl mezi vnější stěnou a okolím)

Pro zjednodušení byla rychlost vzniku tepla vzata za konstantní. Ve skutečnosti je funkcí teploty a rozložení teploty v pufru, která má parabolický profil. Za stejných podmínek (stejně elektrické pole, použitý pufr, struktura mikrokanálů) teplota závisí pouze na materiálu čipu a na součiniteli prostupu tepla do okolí. Z toho důvodu pro sklo a křemíkové čipy je vyšší k a h , což vede ke snížení teploty, zatímco u čipů z polymerů významně narůstá teplota v důsledku nízkého k a h . Petersen a jeho kolektiv [39, 40] prezentovali údaje o mikročipech vyrobených z různých materiálů. Zkoumají různé geometrické tvary mikrokanálu vyplněného různými pufrů o určené elektrické vodivosti. Výsledkem jejich práce bylo určení horní hranice (limit) použitelného napětí. Jejich prezentované výsledky popisují jev od začátku měření až do varu pufru. Zjistili, že použití skleněných nebo křemíkových mikročipů umožňuje aplikovat třikrát vyšší napětí, ve srovnání s křemennými kapilárami. To se týká i plastů, a také nejčastěji elastomeru PDMS používaného pro mikročipovou techniku.

Radiální teplotní gradient ΔT_x pufru lze vypočítat podle vztahu [40]:

$$\Delta T_x = \left[\frac{r_1^2 - x^2}{2k_b} + \frac{r_1^2}{k} \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{r_1^2}{r_2 h} \right] \quad (3)$$

kde: x – poloměr mikrokanálu

k_b – tepelná vodivost pufru

Pokles teploty, od středu kanálu ($x=0$) na rozhraní tekutina – pevné těleso ($x=r_1$), je určený jako $\Delta T r_1 = Q r_1^2 / 4 k_b$, tudíž teplotní gradient je velmi podobný u všech mikročipů vyrobených z různých materiálů. Parametry mikročipu, jako jsou vnější rozměry, tepelná vodivost a přenos tepla do okolí, nemají přímý vliv na teplotní profil v průřezu kanálu. Obecně se uznává, že radiální teplotní gradienty jsou menší než 1,5 K, a neměly by ovlivnit

výkonnost. Stručně řečeno, s cílem snížení intenzity elektrického pole a Joulova tepla Q (omezujícího výkon analýzy), je možné snížit elektrickou vodivost pufru (změnou hodnoty pH roztoku), snížit příčný průřez kanálu a změnit délku separačního kanálu. Dalším důležitým jevem spojeným s Jouleovým teplem je teplotní skok v axiálním směru [41]. Zvýšené tepelné efekty zásobníků pufru a vzorku nacházejícího se v nádržích na obou koncích mikrokanálu způsobují výskyt řady jevů: za první, dochází k výraznému zvýšení teploty, za druhé, místní elektrické pole se zvyšuje při zachování konstantního proudu, za třetí, tlakové gradienty musejí být udržovány tak, aby se zachovala hmotnost, což má vliv na profily křivek rychlosti a zvýšení molekulární difuze, která přispívá ke zvýšené disperzi vzorků. Mikrofluidní systémy jsou dále vybaveny mikrozásobníky a složitou sítí mikrokanálů, obvykle kříženou separačním kanálem, což také může vést k nestejnorodosti profilu teploty v axiálním směru.

Yang a jeho kolektiv [42] ve své práci diskutovali o vlivu Joulova tepla na elektroosmotický průtok (EOF) a elektrokinetický transport. Zjistili, že tyto jevy vedou ke zvýšení difuzního koeficientu vzorku, změně rozložení teploty ve vzorku, a také byly sledovány nestejnorodé rychlostní profily. Ve skutečnosti je většina mikrofluidních kanálů o obdélníkovém tvaru. Z toho důvodu lze v ustáleném stavu problém přenosu tepla vyřešit pomocí dvourozměrné rovnice:

$$\frac{\partial^2(T-T_0)}{\partial^2x} + \frac{\partial^2(T-T_0)}{\partial^2y} = -\frac{Q}{k} \quad (4)$$

kde: x – výška mikrokanálu

y – šířka mikrokanálu

Vliv Jouleova tepla na elektroosmotický průtok a elektroforetický transport v obdélníkovém kanálu je široce popsán v literatuře [43, 44]. U mikročipů vyrobených ze stejného materiálu umožňuje obdélníkový tvar kanálů nejefektivnější odvod tepla a minimalizaci ohřevu Joulovým teplem.

Z provedeného podrobného zkoumání a analýzy matematického modelu rozložení teploty v mikrokanálech o různých tvarech byla prokázána Karczemskou [45] optimální geometrie o obdélníkovém průřezu. Tyto výsledky byly potvrzeny dalšími výzkumnými centry, například v práci Fana a Harisona [46].

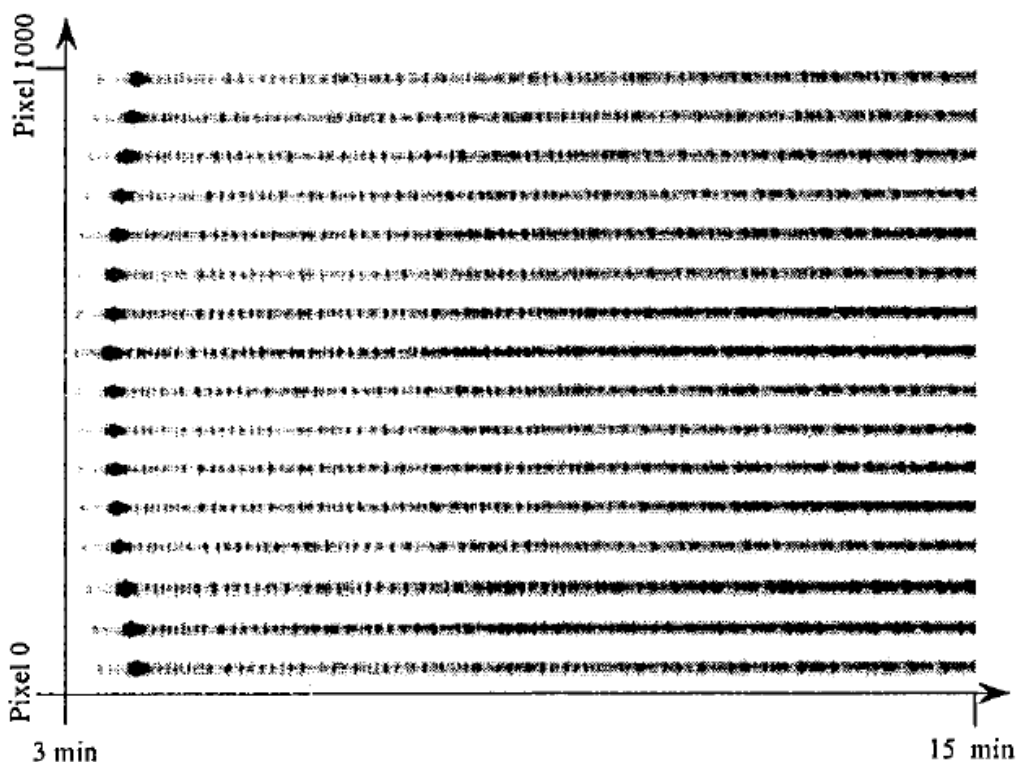
2.1.2 Použití mikročipové elektroforézy

2.1.2.1 Sekvencování DNA

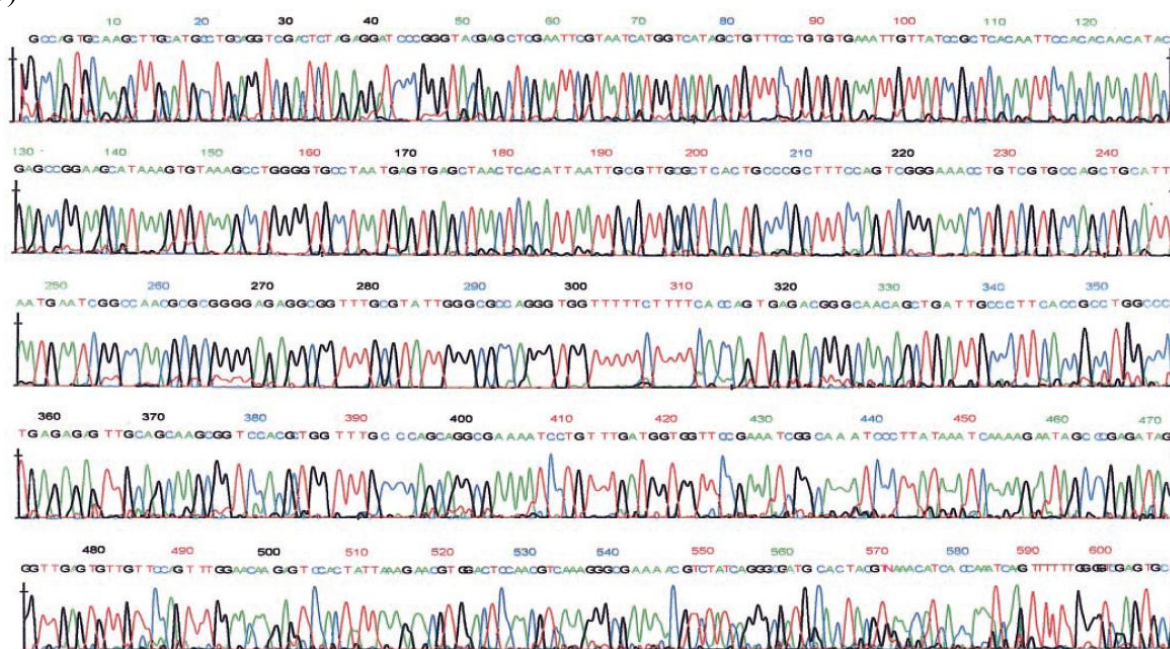
Určování lidského genomu je základem v biologickém výzkumu, ale zároveň přispělo k revoluci ve zdravotní péči a vývoji v oblasti farmaceutického průmyslu [47,48]. To by nebylo možné, kdyby nebyl vývoj laboratorních zařízení, zejména tvorba systémů pro rychlou elektroforézu používanou pro sekvencování DNA, prováděnou prostřednictvím mikročipu [49]. I když je mapa lidského genomu známa, jsou stále hledány nové inovativní technologie, které jsou nezbytné vzhledem k potřebě zvýšení produktivity a propustnosti sekvencerů. Moderní přístroje jsou založeny na použití mikročipové technologie pro mapování genomu člověka a dalších živočišných druhů.

V roce 1995 bylo poprvé uvedeno sekvencování DNA prováděné pomocí sítě kanálů na mikročipu. Woolley a Mathies [6] prokázali zkoumání DNA s použitím kanálu o délce 3,5 cm. Dosáhli 97% přesnosti v určení více než 200 párů bází v době 7 min. Získaná rychlost oddělování je 2400 párů bází za hodinu. Další výzkumná skupina [50] ukázala větší přesnost a rozlišení párů bází pomocí kanálů o délce 7,5 cm kontinuálně vyplněných lineárním polyakrylamidem (LPA). Autoři získali 99,4% přesnost pro 500 párů bází v průběhu 20 min. a použitím čtyřbarevného detekčního systému (jedna barva pro každou bázi). Dosáhli mnohem kratší doby analýzy ve srovnání se standardní kapilární elektroforézou, která umožňuje maximální detekční rychlost kolem 250 – 500 párů bází za hodinu. Liu a jeho kolektiv [51] představil paralelní sekvencování v 16 kanálech, vyplněných LPA (lineární polyakrylamid). Tyto kanály byly o délce v rozmezí od 7 do 7,6 cm, detekce byla provedena pomocí čtyř barev na skenovacím konfokálním mikroskopu přes indukovanou fluorescenci. Na obrázku 10 a je uvedeno oddělování 450 párů bází dosažené za 15 min. Na obrázku 10 b je uveden elektroforegram ukazující množství informací shromážděných v průběhu separace DNA. Celková doba oddělování včetně zavedení zkoumaných vzorků byla 18 min. Vyrobený systém byl plně automatizován, poskytoval možnost rozdělování několika vzorků současně (8 ve stejné době) a také detekci ve všech kanálech současně.

a)



b)



Obr. 10 Elektroforetická separace DNA: a) elektroforegram získaný při zkoumání provedeném současně v 16 kanálech, b) čtyřbarevná analýza sekvencování DNA [51]

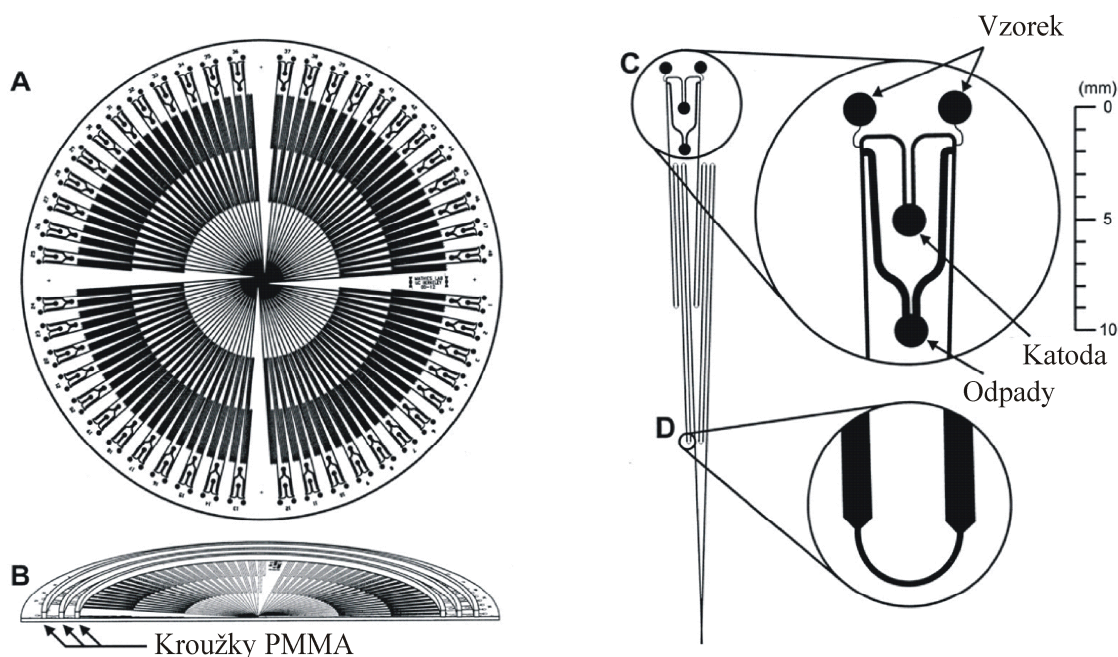
Liu [51] zdůraznil ve své práci několik důležitých aspektů využití mikročipové elektroforézy pro sekvencování DNA. Mikročipy vyžadují zavedení vodných vzorků DNA a kolmost separačního kanálu s ostatními. Ve vodném prostředí vzorků DNA jsou kratší fragmenty

obvykle více koncentrované, než dlouhé fragmenty. Celková pohyblivost všech fragmentů v gelu je menší než ve vodě, zatímco fragmenty v gelu jsou koncentrovanější. Větší fragmenty se více koncentrují a pomaleji pohybují. Rozdíly v různé koncentraci vytváří efekt bilance intenzity krátkých a dlouhých fragmentů DNA, což znamená, že profil intenzity je mnohem jednodušší než změny pozorované v kapilární elektroforéze.

Nejnovější řešení zajišťuje dobré rozlišení pomocí vysoce kvalitních detektorů a zvýšení signálů emitovaných z oddělených látek. Yatsushiro a jeho kolektiv [52] ve své práci představil vysoce citlivou metodu detekce DNA pomocí kombinace ethidiumbromidu (EtBr) a SYBR Green II SGII (organická chemická sloučenina) pro mikročipovou elektroforézu. Pomocí těchto dvou barviv byl získán významný nárůst fluorescence příslušných fragmentů DNA. Elektroforetické oddělování bylo provedeno v agarovém gelu při současném použití konfokálního fluorescenčního detektoru. Autoři této práce jsou přesvědčeni, že vyvinutá metoda se vyznačuje vysokou citlivostí a dobrou přesností měření velikosti a množství DNA a bude využita pro různé biologické a biochemické analýzy.

2.1.2.2 Genetická analýza

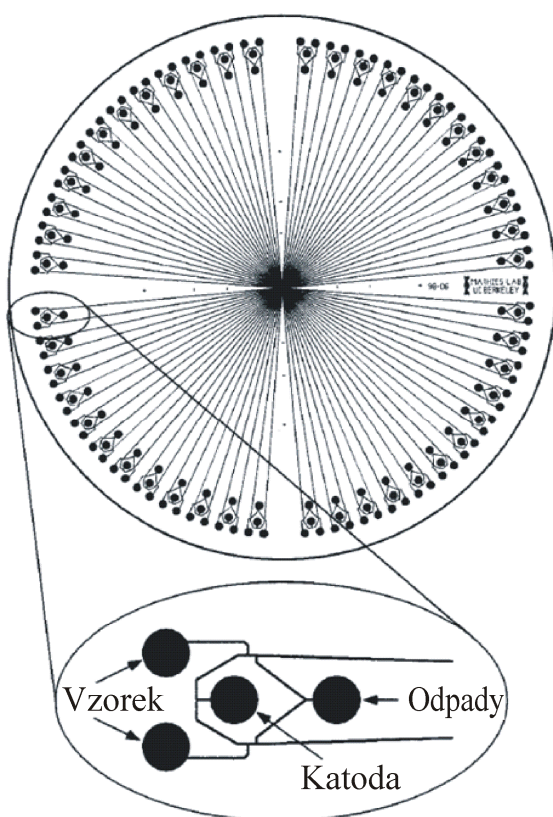
První fáze poznání lidského genomu je sekvencování genetického kódu, který je téměř v 99,9% společný pro všechny lidi [53]. Drobné rozdíly, jako jsou mutace, odstranění části genomu, změna v uspořádání a obecná variabilita, jsou v centru zájmu výzkumníků zabývajících se diagnostikou a léčbou onemocnění. Znalost genetického polymorfismu může také pomoci v predikci účinnosti a zvýšení bezpečnosti farmakologické léčby. Konečným cílem výzkumu je individualizace léčby určená pro jednotlivý genom. Provedení rychlých kontrolních testů vzorků DNA v nemocnicích je nezbytné k diagnóze a použití vhodného postupu léčby. Mathiesova skupina představila jeden z prvních systémů pro genetické analýzy, který je uveden na obrázku 11. Ve skleněné desce o průměru 150 mm pomocí fotolitografických metod vyrobili kanály s hloubkou přibližně 30 μm . Otvory mikrozásobníků o průměru 1,5 mm byly vyrobeny diamantovým vrtákem s použitím techniky CNC. Vyrobené kanály s vyvrtanými dírami byly celé uzavřeny skleněným krytem pomocí tepelné difuze. Na povrch mikročipu se připevnila tři kroužky z PMMA, které byly použity jako toroidní nádrže pro pufr. Například, provedení analýzy 96 vzorků DNA hemochromatózy pomocí tohoto přístroje trvalo 8 minut [54].



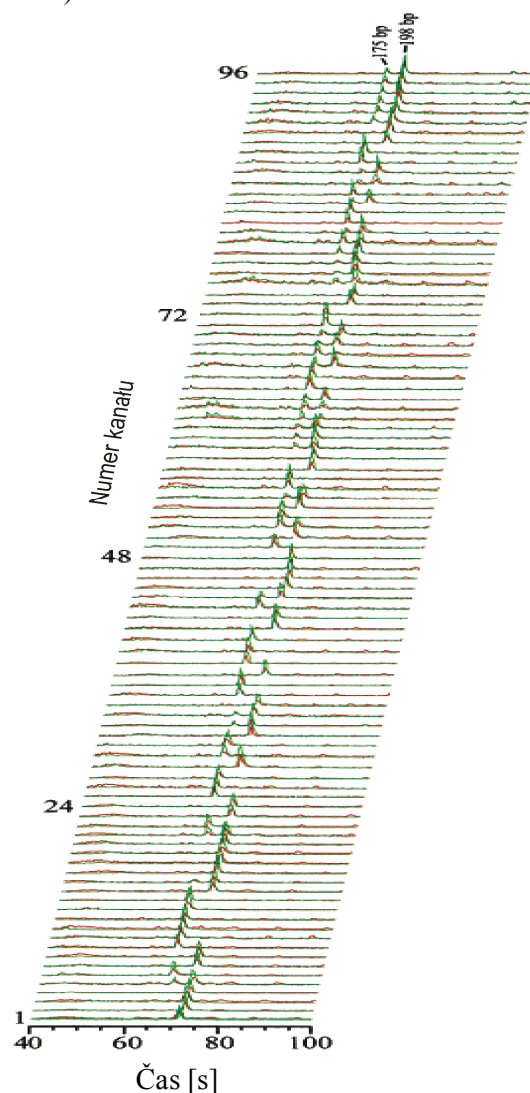
Obr. 11 Schéma 96 kanálového elektroforetického mikročipu pro genetické analýzy. Geometrické rozměry: šířka odpadních kanálů $300\ \mu\text{m}$, separační kanál $85\ \mu\text{m}$, katodový kanál $200\ \mu\text{m}$ [54]

Další konstrukční řešení předložené vědcem Shi a jeho kolektivem [55] je uvedeno na obrázku 12 a obsahuje 96 radiálních kanálů používaných pro vícekanálovou mikročipovou elektroforézu. K detekci tento přístroj používá vysokorotační konfokální laserový skener pro detekci indukované fluorescence. Pomocí této techniky bylo možné sledování a zkoumání genotypu methylenetetrahydrofolátu (MTHFR) v 96 kanálech současně. Provedená analýza trvala 100 s, získaný elektroforegram ze separací je uveden na obrázku 12 b. Prezentovaný mikročip byl schopen analýzu opakovat 100 krát bez snížení výkonnosti kvůli použitému vysokofrekvenčnímu skeneru. Autoři této práce předpokládají použití této techniky pro detekci v 384 kanálech současně bez větších poklesů výkonnosti.

a)



b)

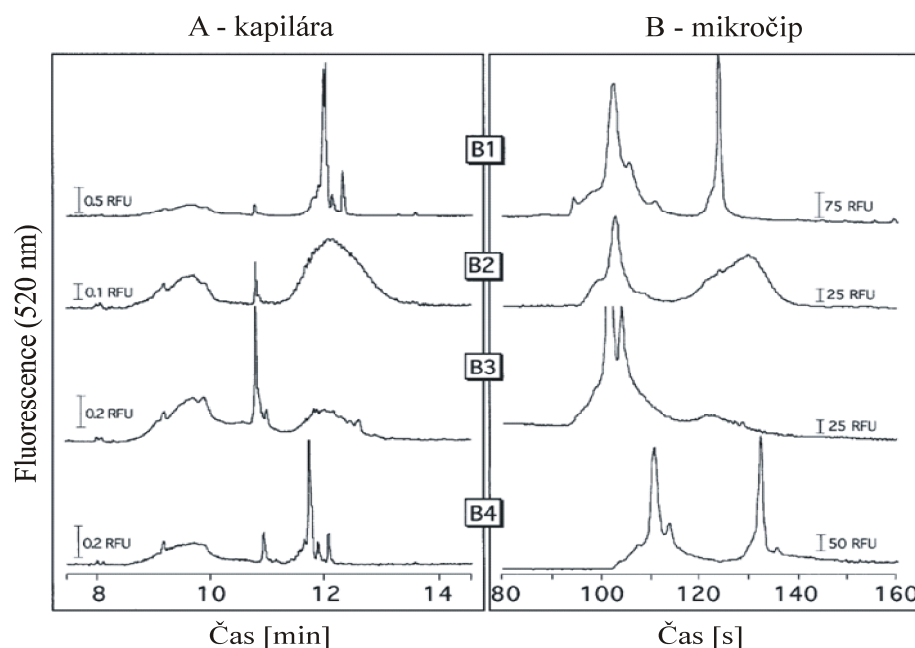


Obr. 12 a) Elektroforetický mikročip pro genetické analýzy skládající se z 96 kanálů. Separační kanál 200 μm ve tvaru T - injekce, šířka kanálu 110 μm , hloubka 50 μm a průměr nádrží 1,2 mm. Separační kanál ve vzdálenosti 33 mm od detektoru, průměr mikročipu 100 mm

b) Electroforegram z 96 kanálů pro MTHFR genotyp získaný v čase kratším než 100 s. Byly použity dva typy fluorescenčních markérů pro označení a detekce [55]

Munro a jeho kolektiv [56] uvádějí ve své práci podrobné genetické analýzy buněčného lymfomu pomocí mikročipové elektroforézy. Detekce onemocnění je založena na základě analýzy rozdělení fragmentů DNA. Rakovinné buňky často vykazují kolonizaci hlavně jedné délky DNA, zatímco normální buňky jsou různých velikostí. V provedených zkoumáních porovnali kapilární elektroforézu CE s mikročipovou MCE s fluorescenční detekcí. Na obrázku 13 se pro vzorky B2 a B3 ukázal negativní výsledek testu pro lymfocyty B na

základě širokého rozložení velikosti fragmentů DNA. V případě vzorků B1 a B4 byl získán pozitivní výsledek charakterizovaný úzkým píkem prokazujícím dominance DNA jediné délky. Kompletní mikročipová analýza polymerázové řetězové reakce DNA fragmentů trvala méně než 160s, ve srovnání s 13 minutami pro konvenční techniku CE s obdržení totožných výsledků diagnózy. Vyrobený mikročipový systém se vyznačoval rychlostí 60 krát vyšší ve srovnání s konvenčními gelovými technikami.



Obr. 13 Diagnóza přeskupení genů lymfomu (latina lymfomu) pomocí kapilární elektroforézy (A) a mikročipu (B) [56]

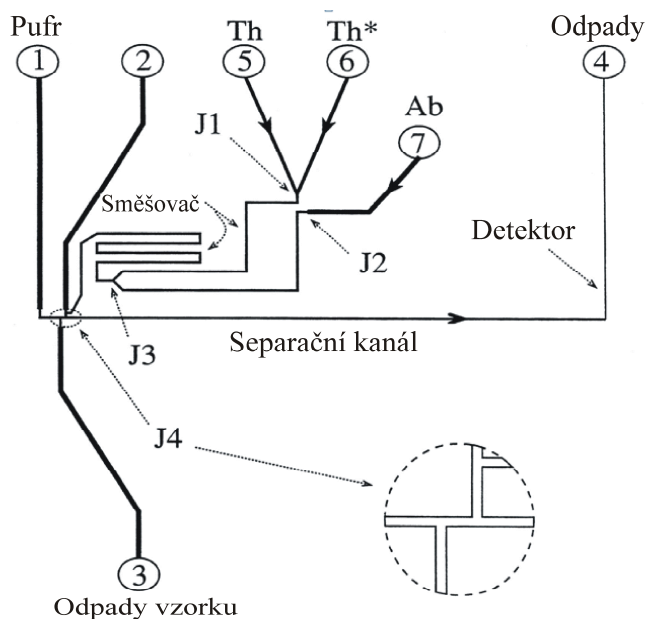
Nejběžnější technikou v oblasti genetické analýzy je použití laserové indukované fluorescence (LIF) v kombinaci s mikročipovou elektroforézou (MCE), což zaručuje vysoké rozlišení metody. Rech a jeho kolektiv [56] vyvinuli řešení založené na lavinové fotodiode jednotlivého fotonu (SPAD - Single Photon Avalanche Diode). Jedná se o nejnovější a nejlevnější řešení sloužící pro detekci genotypů vyznačující se trvanlivostí, nízkým napětím, nízkou spotřebou a miniaturní velikostí. Autoři této práce předkládají své řešení jako kompaktní systém pro genetickou analýzu, která umožní stanovení nových genotypů a otevírá novou cestu pro levné a přenosné zařízení.

2.1.2.3 Imunologické testy

Imunologické testy se používají k určení biologických látek pomocí reakce antigen – protilátka. Tyto testy jsou často velmi selektivní a schopné detekovat biologické sloučeniny s velmi nízkou koncentrací. Z hlediska její selektivity a citlivosti, imunologické testy jsou

mocným nástrojem v klinických laboratořích a také pro vývoj léků. První literární informace o provádění imunologických testů provedených s použitím mikročipů se objevily v roce 1996. Koutný a jeho kolektiv [58] vyvinuli imunologické testy pro stanovení koncentrace kortizolu v krevním séru pomocí mikročipu vyrobeného z křemíku. Rozdělení činidel bylo zrealizováno v čase kratším než 30 sekund. Další práce ukazující podobné testy provedené pro stanovení tyroxinu (T4), který může souviset s nemocí štítné žlázy, kterou představil Schmalzing a jeho kolektiv [59]. Inkubace a stanovení rozdělovaných sloučenin byly připraveny mimo čip. Tento proces trval 25 – 30 min což kompenzuje krátký 30 sekundový čas separace. Obě práce ukázaly velké potenciální využití mikročipu v imunologických testech. Inkubace a stanovení sloučenin byly prováděny mimo čip.

Harrison a jeho kolektiv [60] vyvinul imunologické mikročipové testy pro stanovení teofylinu (Th) ve vzorcích krevního séra. Testy byly prováděny po dobu několik týdnů na stejném čipu bez změny rozlišení a přesnosti. Detekční limit pro teofylin je 1,25 ng/ml nebo 6,9 nM ve zředěném séru. Imunologické testy teofylinu byly provedeny na mikročipu s integrovaným imunoreaktorem, který je znázorněn na obrázku 14.



Obr. 14 Mikročip s integrovanými kanály imunoreaktoru. Úsek J1 - J3 byl použit k míchání s antigenem a značkovací látkou. Úsek J3 - J4 byl použit k míchání (Th) s antigenem a značkovací látkou. Ve zvětšení je uveden systém dvojité T - injekce [60]

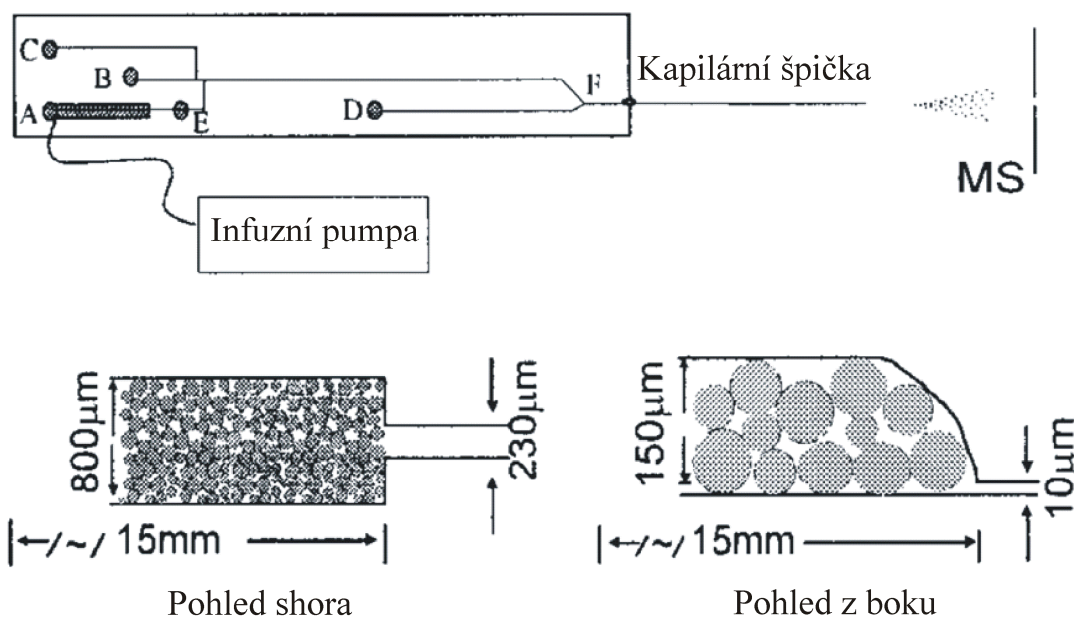
Vzorky séra, označeny teofylinem a protilátkou anti – teofylinem byly míchány elektroosmotickým průtokem. Negativní napětí bylo přivedeno do zásobníku odpadů, což způsobilo průtok roztoku ze třech zásobníků do směšovacího kanálu. Vzorek byl zaveden do

2.1.2.4 Bílkoviny a peptidy

Mapování peptidů je důležitou metodou pro identifikaci a charakterizaci funkce proteinů. Typická peptidová mapa je získávána enzymatickým trávením bílkovin a chromatografickým anebo elektroforetickým rozdělováním zbývajících fragmentů. Kombinace metody UV (ultrafialové záření) a MS (hmotnostní spektrometrie) je široce používána pro detekci. Vyhledávání v databázi hmotností peptidů může být použito k identifikaci neznámého proteinu. Vysoce výkonné dvousměrné (2D) gelové oddělování ve spojení s kapalinovou chromatografií (LC) – MS mapující jednotlivá místa proteinů poskytuje podrobné informace na téma proteomu. Větší efektivita testů je nutná, protože lidské proteomy mohou obsahovat 10^6 proteinů včetně strukturálních a post-translačních modifikací [63].

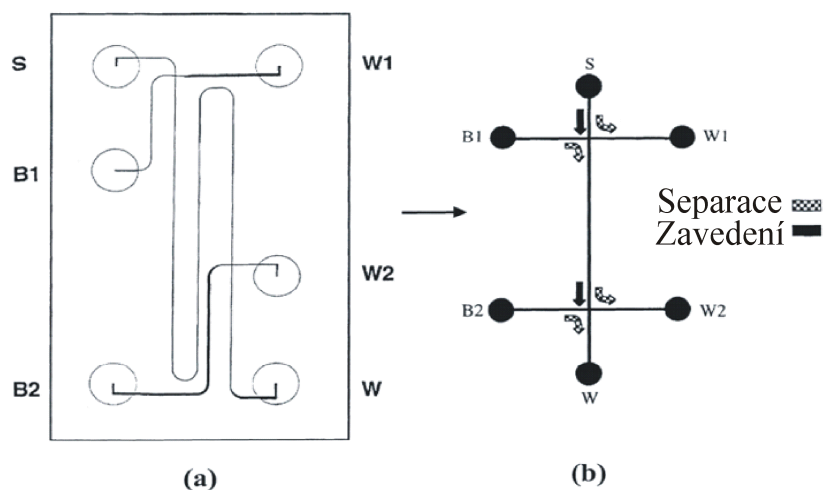
Studii vývoje analytického systému pro rychlou mikročipovou CE – MS analýzu proteinů a peptidů se zabývá mnoho vědeckých skupin. V literatuře je běžně uváděna kombinace mikročipů CE s hmotnostní spektrometrií (MS – MS) s cílem získání informací o sekvenci proteinu. Fragment informací o proteinu lektinu (*Pisum sativum*) byl získán během 6 minutové analýzy, a zkoumání vyžadovalo pouze 150 fmol bílkovin. Krátký čas MS analýzy byl rozšířen o trávení bílkovin, které bylo vedené mimo mikročip a trvalo 10 hodin [64].

Harrisonova skupina [65] vyvinula systém mikročipu CE s integrovaným podkladem (substrátem) pro trávení bílkovin. Přístroj se skládal z velkého kanálu (o šířce 800 μm , 150 μm a délce 15 mm), vyplněného pomocí podtlaku kapkami pokrytými trypsinem. Mikročip byl připojen ke kapiláře, která sloužila jako rozhraní do hmotnostního spektrometru. Proteiny byly do podkladu dopraveny vyvoláním tlaku indukovaného vnějšími infuzními pumpami, a pak elektrokineticky zavedeny do separačního kanálu. Provedené trávení třech modelů bílkovin: melittinu, cytochromu c a bovinního sérového albuminu. Kompletní enzymatické rozdělení melittinu vyžadovalo pouze 5 s ve srovnání s 15 minutami při trávení bílkovin bez použití mikročipové techniky. Celková doba analýzy cytochromu c byla 3 minuty pro trávení a 45 sekund pro elektrokinetickou separaci a infuzi do hmotnostního spektrometru. Stanovení hovězího séra albuminu vyžádalo 6 minut pro celkovou analýzu. Na obrázku 16 je schematicky zobrazen elektroforetický mikročip pro analýzu pomocí trypsinu jako enzymu pro trávení proteinu.



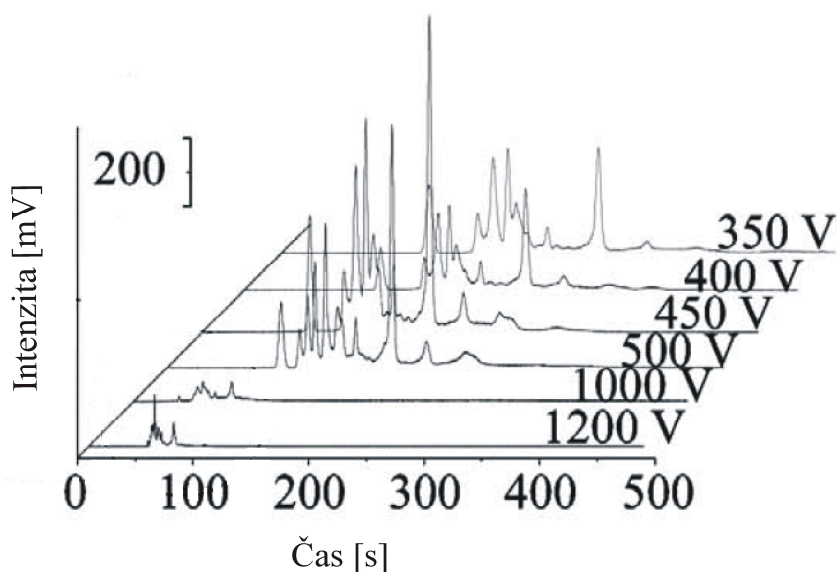
Obr. 16 Schéma integrovaného elektroforetického mikročipu s podkladem vyplňujícím mikrokanály. Pohled shora a boční ukazuje hustotu podkladu trypsinu. Ostatní rozměry jsou: šířka kanálu 230 μm u zásobníků, šířka hlavního kanálu 30 μm . Hloubka kanálu je 10 mm po celé délce [65]

Složitost biologických vzorků a map peptidu často vyžadují použití rozsáhlých technik oddělování, což znamená, že je žádoucí vysoké rozlišení měření. Analýza velkého množství peptidů může být provedena v režimu multirozměrové separace, ve které je analyzovaný vzorek různými mechanismy oddělován. Například, dvourozměrná (2D) elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) odděluje sloučeniny na bázi izoelektrického bodu (pI). V prvním rozměru je definována molekulová hmotnost a ve druhém rozměru velikosti. Hlavní nevýhodou tohoto řešení je dlouhá doba výzkumu, která může trvat dokonce 1 až 2 dny. Mikročipy mohou být komplexními systémy schopnými rychle vícerozměrně oddělovat látky. Rocklin a jeho kolektiv [66] navrhl čip obsahující kanály pro micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC) a mikročipovou elektroforézu MCE. Metodika studie 2D a schéma geometrie kanálu je znázorněna na obrázku 17. Autoři práce dokázali v průběhu 2D analýzy mnohem větší oddělování pro fluorescenčně značené peptidy trypsinu z cytochromu c. Komplettní analýza trvala pouze 10 minut.



Obr. 17 Schéma mikročipu používajícího dvourozměrnou techniku: a) struktura mikročipu, b) schéma provedení zkoumání, S - zkoumaný vzorek, B – pufr, W - odpad [66]

Nagata a jeho kolektiv [11] uvedli mikročip vyrobený z křemenného skla, který využíval detekční techniku laserové indukce fluorescence (LIF) pro analýzu bílkovin. Délka separačního kanálu byla 21 mm. Velikost mikročipu byla 35 x 12,5 x 1,25 mm s kanály ve tvaru kříže o šířce 110 μm a hloubce 50 μm . Tyto proteiny byly označeny fluorescenčním činidlem a smíchány s Tris a SDS pufrů. Laserová detekce byla provedena s vlnovou délkou 530 nm. Autoři popisují optimalizování elektroforetických podmínek a koncentrací pufrů. Obdrželi krátké doby analýz přibližně 160 sekund, včetně detekce. Na elektroforegramu uvedeném na obrázku 18 je možné vidět intenzity píku ve funkci přivedeného napětí a doby měření.

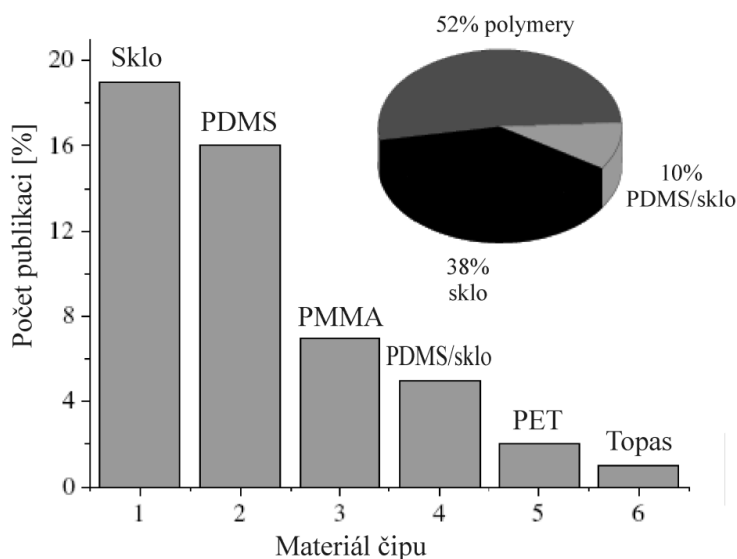


Obr. 18 Elektroforegram komplexu SDS – bílkovina. Rozsah napětí od 350 V do 1200 V [11]

2.2 Materiály používané na výrobu mikročipů

Použití vhodných materiálů pro výrobu elektroforetických mikročipů má významný vliv na výkonnost těchto zařízení. Elektrody a mikrokanály vyrobené z různých materiálů mohou ovlivňovat získané výsledky. Tudíž volba materiálu je hlavním faktorem, který určuje užitnou hodnotu zařízení [67].

Hlavním problémem při mikročipové elektroforéze je generované teplo vlivem vysokého elektrického pole přivedeného do elektrod během procesu elektroforézy. Vznikající teplo způsobuje řadu nežádoucích jevů, které se vyskytují nejen v pufru a vzorku vyplňujícího mikrokanály, ale také může dokonce způsobit deformaci mikrostruktury. To se týká především čipů vyrobených z polymerů. Z toho důvodu je nejdůležitějším parametrem pro efektivní mikročipy účinný odvod vznikajícího tepla. Tavený křemen, křemenné sklo, sodno – vápenné sklo jsou nejčastěji používané materiály v raném stádiu vývoje mikročipových systémů elektroforézy [12,68,69]. Křemenné mikročipy s dobrými fyzikálně – chemickými vlastnostmi se používají málo s ohledem na jejich vysokou cenu [70]. V současné době je častým řešením kombinace skleněného krytu z plastů s vyrobenou strukturou na povrchu. Nicméně, často se spojují dohromady prvky mikročipů ze stejného materiálu. Mikrostruktury z plastů se především vyrábí z: poly(dimetylosiloxanu) (PDMS) [71,72,73], poly(metakrylan metylu - polymethylmethakrylát) (PMMA) [74,75,76], poly(tereftalan etylenu - polyethylétereftalát) (PET) [77,78,79], polykarbonátu (PC) [74,80,81], termoplastických amorfních olefinových polymerů (s obchodním názvem Topas) [82,83,84] a také křemíku [85,86]. Xu, Wang a Chen [87] ve své práci předložili přehled (obrázek 19) nejčastěji používaných materiálů pro elektroforetické mikročipy.



Obr. 19 Použití různých materiálů v mikročipové elektroforéze [87]



PDMS a PMMA přilákali pozornost výzkumníků z hlediska jejich vynikajících vlastností, jako jsou nízké náklady, jednoduchost výroby a transparentnost. Wong a Ho [88] uvedli ve své práci výhodnost použití PDMS nad PMMA popisující jejich mnohem širší možnosti fyzikálních a chemických povrchových úprav. V případě některých proteinů, se vyskytuje nutnost použití mezivrstvy oddělující mikrokanál a zkoumaný analyt. Tokachichu a Bhushan [89] zjistili, že PDMS se vyznačuje lepší přilnavostí, než PMMA, vzhledem k vysoké povrchové energii. Zatímco PDMS má silný hydrofobní charakter povrchu. Autoři v této práci prezentovali výsledky povrchové modifikace a zjistili, že po této úpravě, oba materiály mají podobné vlastnosti povrchu.

Liu a jeho kolektiv [90] ve své práci představili mikročip vyrobený z PET s elektrochemickou detekcí pomocí mikroelektrody Pt pro označování paracetamolu. Získané výsledky ukázaly, že mikročip vyrobený z PET měl lepší výkonnost než vyrobený z PDMS. Autoři práce připisují tuto vlastnost lepší tepelné vodivosti materiálu. Jednoduchost výroby a nízké náklady na sériovou výrobu určují velký příslib pro použití tohoto materiálu pro klinické analýzy a kontroly kvality léčiv.

Becker a Locasio [91] ve své práci uvedli různé typy polymerních materiálů pro výrobu mikročipů. Autoři také uvedli, že z hlediska vlastností skla je velmi atraktivním materiálem pro mikročipy, ale složitost a náklady na jejich výrobu způsobují nutnost vyhledávání jiných náhradních materiálů. Použití plastů snižuje náklady a urychluje proces výroby.

Fintschenko a Van den Berg [92] v jedné ze svých prvních prací provedli podrobnou analýzu výhod a nevýhod křemíku pro aplikace v mikroelektroforetické separaci analytů. Zjistili, že použití křemíku jako materiálu pro výrobu elektroforetického mikročipu je omezeno potenciálem průrazu, který prakticky eliminuje tento materiál z důvodu potřeby aplikace vysokých napětí.

Velmi slibným řešením se zdá být výroba mikročipů z polykrystalického CVD diamantu. Použití materiálu s velmi vysokým koeficientem tepelné vodivosti zajišťuje efektivní odvod tepla ze struktury do okolí. Diamant je chemicky odolný a může být použit i pro vysoce koncentrovaná agresivní činidla. Nevýhodou tohoto řešení je složitý, drahý a časově náročný proces výroby. Nicméně, vzhledem k jeho odolnosti může být použit několikrát [8,29].

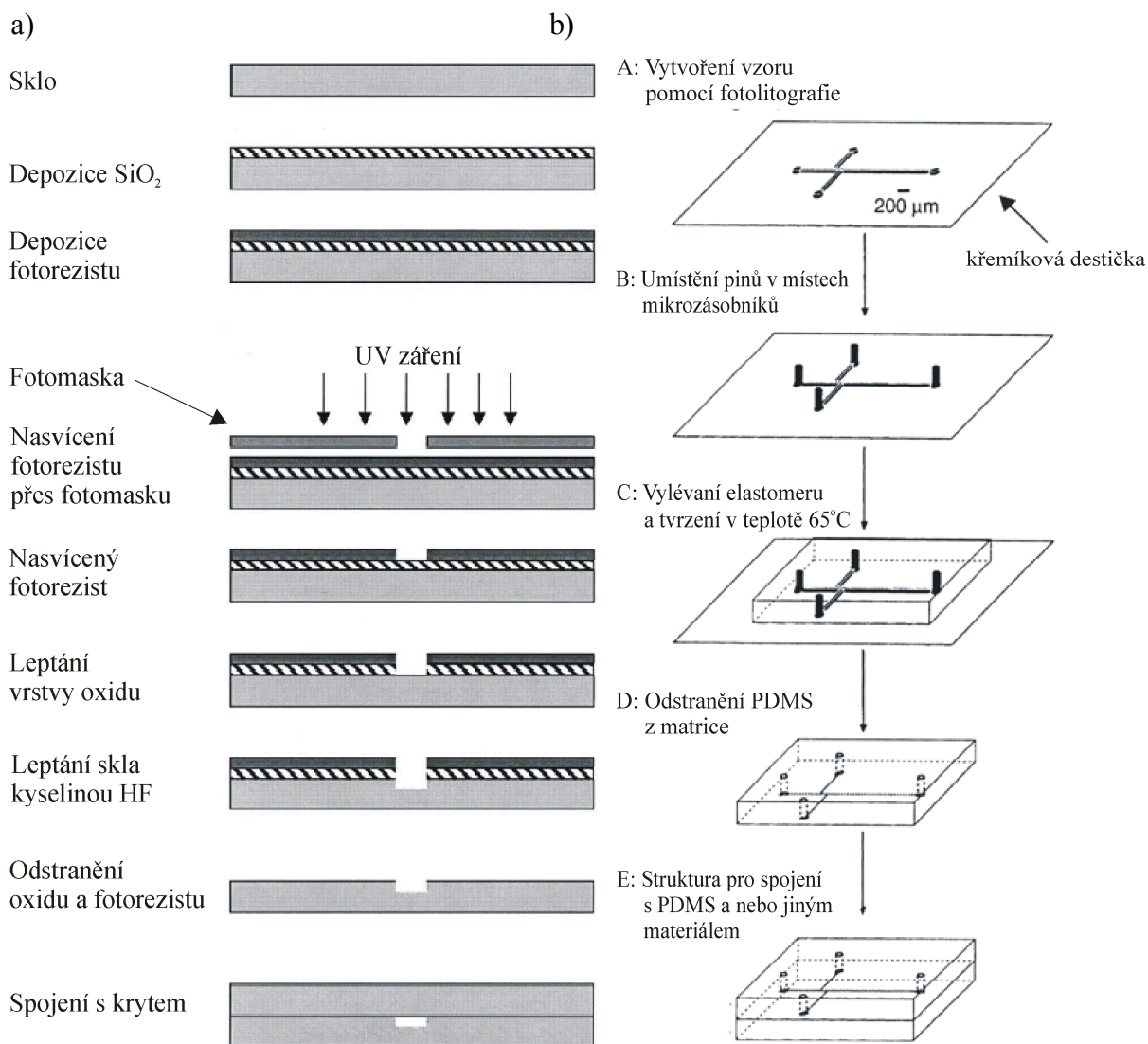
2.3 Techniky výroby

Vývoj polovodičového průmyslu přispěl ke vzniku velmi kvalitních struktur z křemíku vyrobených pomocí fotolitografie. Tato technika může být úspěšně používána k vyrobení malých definovaných kanálů v různých materiálech a aplikována při výrobě systémů

mikročipové kapilární elektroforézy MCE. Použití správné výrobní technologie závisí především na materiálu a velikosti a přesnosti s jakou mají být vyrobeny mikrokanály. Prvním krokem při výrobě mikročipového systému kanálů je vytvoření geometrie struktury a její přenesení na fotomasku. Fotomasky jsou šablony mikrostruktury a nejčastěji jsou vyrobeny ze skla potaženého chromem. Chromové masky jsou nejpříznivější, protože poskytují nejlepší rozlišení pro malé části ($<1 \mu\text{m}$). Je zde také možnost expozice fotomasek prostřednictvím čočky. Při použití této metody může být maska větší, než velikost mikrostruktury. Další technika pro výrobu těchto masek je například tisk na folie ve vysokém rozlišení obrazu. Toto řešení je jednoduché a levné v provedení, ale není možné dosáhnout srovnatelného rozlišení jako je tomu v případě chromové masky [93].

První vyrobené čipy byly vyrobeny ze skla, protože v té době tato technika byla dobře zpracována a známa [4]. Na obrázku 20 a je schematicky ukázána kompletní technologie na výrobu skleněných mikročipů. V první fázi jsou tenké skleněné desky potaženy vrstvou oxidu a fotorezistu. Fotorezisty jsou organické materiály sloužící pro nanesení požadovaných vzorů na povrch. Existují dva typy rezistů, pozitivní a negativní, používané v závislosti na volbě zvýšení nebo snížení rozpustnosti fotorezistu. Výběr konkrétní metody závisí na fotomasce a požadovaných mikrotvarech. Následující schéma ukazuje pozitivní fotomasku, která po nasvícení způsobuje tvrdnutí fotorezistu. Po opláchnutí nenasvíceného fotorezistu získáváme tvar mikrostruktury nanesený na sklo. Obvykle se pro leptání kanálů používá kyselina fluorovodíková (HF). Kryt ze stejného materiálu s vyvrtanými otvory pro zásobníky vzorků a pufry je trvale připojen pomocí difuzního spojení [94].

Schéma výroby poly(dimethylsiloxanových) PDMS mikročipů je uvedeno na obrázku 20 b. V tomto případě se používá matrice sloužící k odvozování tvaru v PDMS. Nejjednodušší technikou výroby matic pro tvarování mikrostruktur z PDMS je nasvícení negativní světlocitlivé emulze na skleněné nebo křemíkové desky. Pod vlivem UV záření na emulzi dojde k vytvrdnutí. Po následném opláchnutí nenasvíceného rezistu získáváme matici, na kterou se odlévá elastomer. Po vyhřátí při teplotě kolem 65°C následuje polymerizace PDMS. Po odstranění matrice získáváme připravenou mikrostrukturu, která se prostřednictvím aktivace povrchu v kyslíkové plazmě spojuje s krytem vyrobeným z PDMS, skla, křemíku nebo prakticky jakéhokoliv materiálu. Velkou výhodou této techniky jsou dobré fyzikálně – chemické vlastnosti PDMS, možnost použití matrice několikrát, a také krátká doba výroby těchto zařízení nepřesahující 1 hodinu [95].



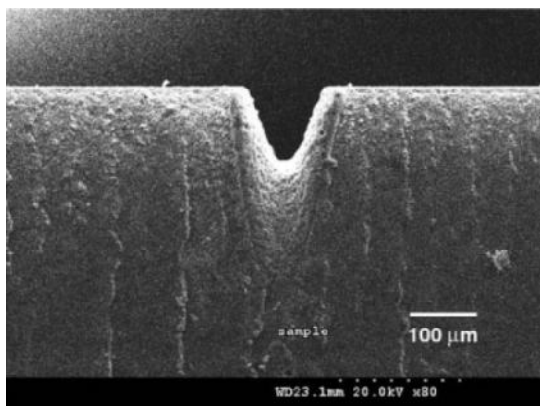
Obr. 20 Technologie výroby mikročipů: a) pro skleněný čip [4], b) pro čip vyrobený z PDMS [96]

Kromě PDMS existuje mnoho dalších plastů a polymerů, které se také používají pro elektroforetické mikročipy. V první řadě jsou nejčastěji používány poly(methylmethakrylátové), PMMA, polykarbonát PC, PS polystyren, poly(ethyltereftalát) PET. Polymerní mikročipy, jako jednorázová zařízení, jsou zajímavé z hlediska nízkých výrobních nákladů a možností sériové výroby. Hlavní výrobní technikou je vstřikování, horká ražba, laserová ablace a výrobní proces pomocí LIGA (z něm. Litographie Galvanoformung Abformung) [97]. Tyto techniky jsou mnohem levnější a jednodušší, a nevyžadují speciální zařízení pro leptání a určité požadavky na čistotu prostorů, jak je to nezbytné při výrobě skleněných mikrostruktur. Až do současnosti plastové mikročipy neodpovídaly výkonnosti čipů vyrobených z jiných materiálů. Je to hlavně díky jejich nízkému koeficientu tepelné vodivosti, který způsobuje mnohem slabší odvedení

generovaného tepla v procesu elektroforézy. Nicméně, s rostoucím počtem a různorodostí polymerů a jejich snadnou možností funkcionalizovat polymerní povrch, se vyráběné čipy zdají být velmi zajímavé [97].

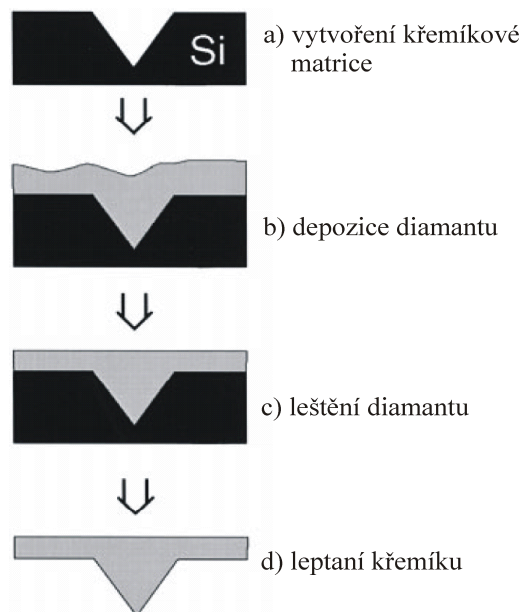
Ued a jeho kolektiv [98] ve své práci představil metodu výroby čipu pomocí techniky LIGA. Ve své práci používali fotolitografie a leptání PMMA pomocí synchrotronového záření. Získaný mikročip byl použitý pro ultrarychlou analýzu DNA. Autoři integrovali do jednoho zařízení: identifikaci genomů jako je extrakce DNA z buňky, reakci polymerázové řetězové replikace PCR, elektroforetickou separaci a detekci.

Sun a jeho kolektiv [99] ve své práci představili mikročip vyrobený pomocí laserové ablace s použitím pro elektroforetickou separaci. Autoři popisují techniku laserové ablace, ve které je laserový paprsek o vysoké energii používán k rozbití vazeb polymeru v určené oblasti. Popsané zařízení bylo vyrobeno z PMMA, profil a geometrické rozměry možné k realizaci touto technikou, jsou uvedeny na obrázku 21. Vědci ve své práci upozornili na vysokou drsnost povrchu mikrokanálu.

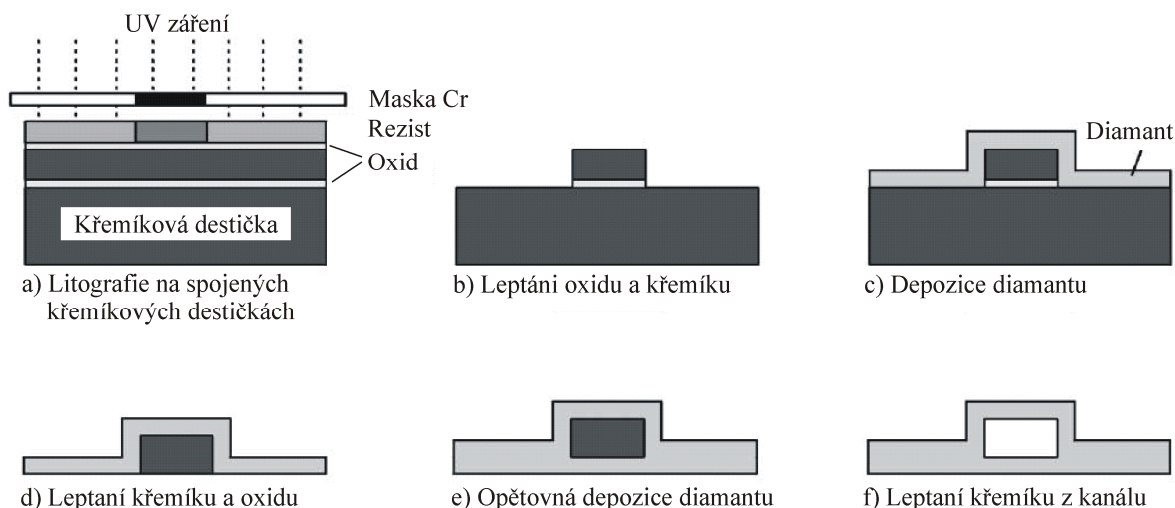


Obr. 21 SEM snímek průřezu mikrokanálu vyrobeného z PMMA technikou laserové ablace, šířka kanálu 150 – 400 μm , hloubka od 50 do 1500 μm [99]

V literatuře jsou také uvedeny údaje o technologii vytvoření mikročipů z polykrystalického diamantu, který se vyznačuje vysokým koeficientem tepelné vodivosti. Bjorkmanova skupina [29,100] ve své první práci prezentovala vytvoření polykrystalických diamantových mikrostruktur. Představili technologii výroby diamantových struktur s použitím techniky dvoustupňového a jednostupňového procesu repliky. Na obrázcích 22 a 23 jsou schematicky ukázány jednotlivé fáze odvozování diamantových struktur použitím metody repliky.

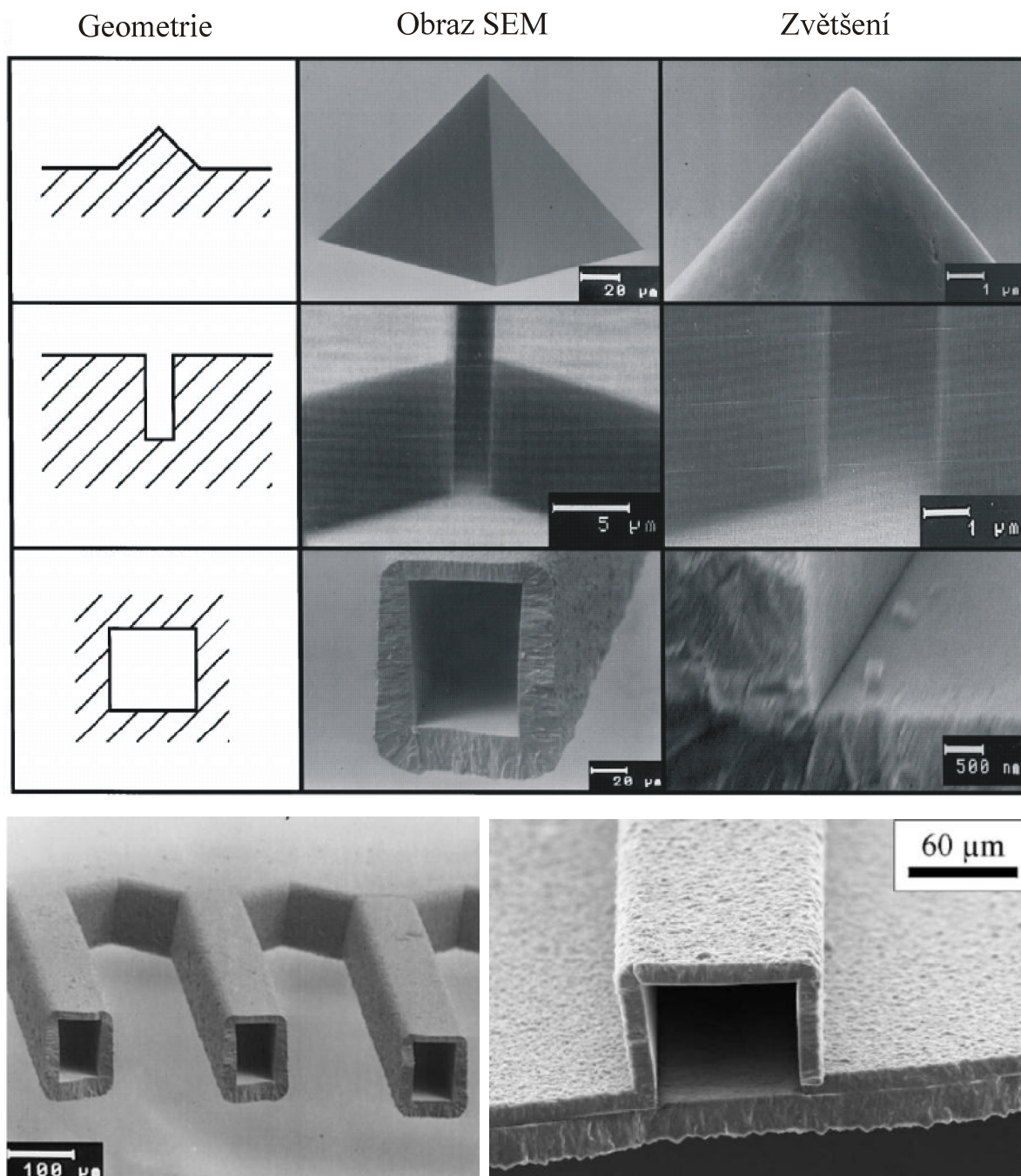


Obr. 22 Schéma ukazující proces výroby diamantové mikrostruktury s použitím metody repliky [100]



Obr. 23 Schéma ukazující etapy dvoustupňového procesu repliky [29]

Uvedená technika je založena na replice trojrozměrného obrazu kanálů vytvořeného z křemíku. Nutnost použití tohoto materiálu je dána aplikací vysokých teplot kolem 800° C během depozice polykrystalické vrstvy pomocí metody CVD. Po depozici vrstvy je odstraněn křemíkový substrát metodou chemického leptání. Autoři při výrobě diamantových mikrostruktur použili metodu se žhavicím vláknem HF CVD (ang. Hot Filament CVD) a také mikrovlnnou metodu MPCVD (ang. Microwave Plasma CVD). Uváděné mikročipy byly použity pro chromatografii bílkovin. Na obrázku 24 jsou zobrazeny struktury získané Bjorkmanovou skupinou.

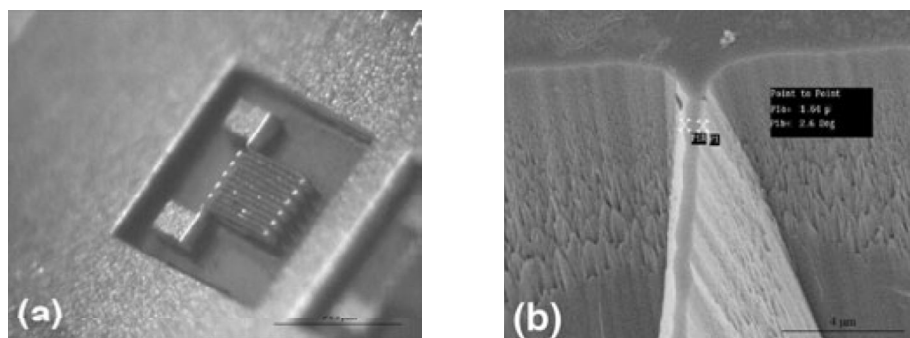


Obr. 24 SEM snímky příkladu diamantových mikrostruktur získaných pomocí jedno a dvoustupňové techniky repliky [29,100]

Známa jsou také konstrukční řešení zahrnující výrobu pouze kritických bodů z polykrystalického diamantu CVD. Adamschik a jeho kolektiv [101] ve své práci představili komplexní systém pro detekci fragmentů řetězce DNA. Přístroj vyrobený autory je z křemíku, polyimidu a diamantu. Použitá technika chemického osazování z plynné fáze CVD umožnila depozici vrstvy diamantu na povrchu mikrokanálů, která poskytuje chemickou inertnost zařízení. Také ostatní autoři se podílí na výrobě mikrostruktur s polykrystalického

diamantu. Například Karabutov a jeho kolektiv [102] ve své práci popisuje techniku odvozování křemíku pomocí metody repliky. Autoři získali struktury o rozměrech menších než 3 μm .

Quest a jeho kolektiv [103] ve svém článku popisuje techniky pro výrobu mikročipů se zvláštním ohledem na způsoby leptání. Reaktivní iontové leptání RIE (ang. Reactive Ion Etching) je ovladatelným procesem suchého leptání využívající kombinaci dvou procesů – chemického, zodpovědného za snížení energie vazeb mezi atomy substrátu a fyzického, ve kterém se pomocí těžkých iontů odstraňuje materiál substrátu s tím, že se bombarduje oblast povrchu se sníženou vazební energií. Tato technika se používá pro anizotropní leptání mikrokanálů. Zejména zajímavou technikou se zdá být leptání ionty reaktivních plynů podporované plazmou ICP – RIE (ang. Inductively Coupled Plasma – RIE). Výhodou této metody je možnost získání vysoké izotropie procesu, díky čemuž je možné získat tvary velké hloubky a úzké na šířku. Plazmo-iontové leptání umožňuje dosáhnout obdélníkového kanálu, což není možné při použití standardních metod pomocí chemických roztoků. Ve své práci autoři prezentují mikrostrukturu vyrobenou na povrchu skla vyleptanou metodou ICP – RIE, uvedenou na obrázku 25.



Obr. 25 Skleněná mikrostruktura vyrobená technikou ICP – RIE o hloubce 80 μm , a) snímek struktury, b) SEM snímek jednotlivé stěny o šířce 2 μm [103]



2.4 Shrnutí přehledu literatury

Na závěr řešení části práce je třeba poznamenat, že rozmanitost metod výrobních postupů a materiálů používaných na mikročipy nabízí skvělé aplikační příležitosti. Bohatá literatura v této oblasti popisuje různé konstrukční řešení pro analýzu různých vzorků, což ukazuje široký zájem o tento předmět - problematiku.

Z provedené literární rešerše jasně vyplývá, že efektivní odvod tepla a jeho sledování během elektroforézy je klíčem k lepšímu rozlišení provedených analýz, stability procesu a snížení doby zkoumání. Dalším důležitým aspektem je, že se zvýšením odvodu Jouleova tepla vznikajícího při elektroforéze se získává minimalizace axiálních a radiálních teplotních gradientů ve struktuře.

Předloženou tematikou se zabývá mnoho výzkumných center po celém světě. Počet publikovaných prací a nevyčerpatelnost nápadů na nové konstrukce mikročipu je obrovská. Dosud nikdo nevyrobil systém, který zajišťuje dokonalé odstranění nežádoucích tepelných jevů. Kompletní řešení pro účinné odvádění Jouleova tepla v mikročipové elektroforéze nebylo dosud předloženo.

3. Cíl a teze práce

Koncepce výroby diamantového elektroforetického mikročipu chlazeného Peltierovým článkem se především zakládá na využití unikátních vlastností diamantu [104]. Vysoký součinitel tepelné vodivosti určuje účinné odvedení Jouleova tepla, generovaného v procesu elektroforézy (zkrácení času analýzy díky použití větších napětí). Současně možnost optické detekce v širokém pásmu a také dobrá chemická odolnost činí tento materiál vhodným pro tyto aplikace. Přesně řízený Peltierův článek ve spojení s diamantovým mikročipem je schopen odvádět Jouleovo teplo vznikající v mikrokanálech. Díky tomu je možno zlepšit teplotní podmínky (jednotný teplotní profil) a také větší výkonnost procesů provedených při použití tohoto zařízení. Navržené spojení elektroforetického diamantového mikročipu s chladicí platformou nebylo zatím publikováno. Diamantové zařízení by mělo mít výrazně lepší užitné vlastnosti ve srovnání s komerčně dostupnými mikročipy vyráběnými ze skel a polymerů.

Na základě provedené literární rešerše a vlastního výzkumu vlastností polykrystalického diamantu je formulována následující teze práce:

„Díky použití diamantu při výrobě mikročipu a také vybavení soustavy Peltierovým článkem je možné získat vhodnější podmínky v průběhu elektroforetických procesů provedených při používání mikročipu.“

Takto definovaná teze jednoznačně určuje cíl práce, kterým je:

„Vytvoření mikroprůtokového zařízení z materiálu o vysoké tepelné vodivosti a také zkoumání možností využití Peltierovy soustavy k chlazení v průběhu elektroforetického procesu provedeného na diamantovém mikročipu.“

Realizace celé práce se skládá z následujících bodů (etap):

- vytvoření křemíkové matrice,
- vytvoření mikrostruktury z polykrystalického diamantu,
- zpracování a vytvoření těsnícího krytu kanálů mikročipu,
- materiálová a geometrická charakteristika diamantové mikrostruktury,
- návrh a konstrukce měřicí soustavy k provedení elektroforetických rozvodů,
- výběr vhodných parametrů a zpracování metodiky měření,
- teplotní měření a stanovení vlivu chlazení u zkoumané soustavy.



4. Vlastní výzkum

4.1 Počítačové modelování

Realizaci diamantového elektroforetického mikročipu předcházela počítačová (MKP) simulace. Cílem simulace bylo potvrzení předpokládaných tezí práce a určení vhodnosti použití diamantu v této aplikaci. Modelování bylo provedeno na Instytucie Technik Elektronowych v Piaszecznie, Polsko. Byl zhotoven model uzavřené struktury vyplněné elektrolytem (pufrem). Do krajních zásobníků bylo aplikováno napětí, které působí na tok proudu přes elektrolyt. Výsledkem přivedeného napětí došlo k ohřevu kapaliny v mikrokanálech přes generované Jouleovo teplo, které je jedním z hlavních omezení v procesu elektroforézy. Vznik tohoto jevu byl analyzován pomocí komerčně dostupného počítačového programu ConventorWareTM [8].

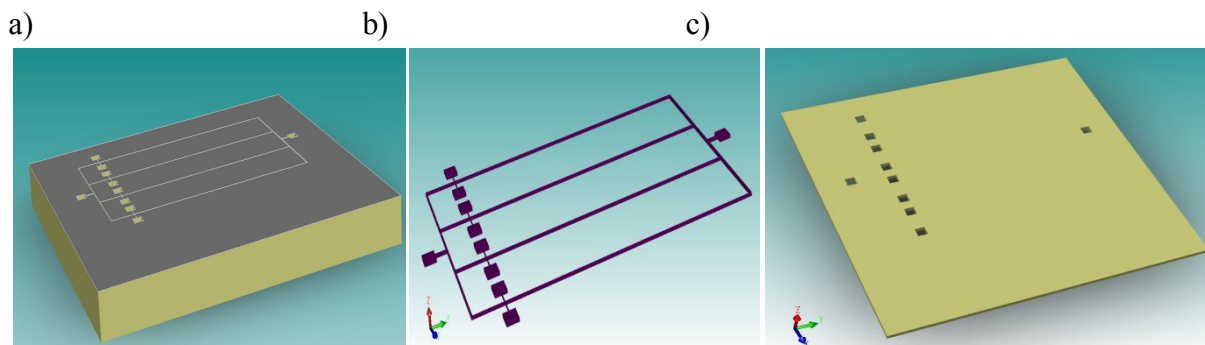
Program ConventorWareTM umožňuje provedení simulace elektro – termo – fluidních jevů vyskytujících se v mikro – měřítku. Hlavní pozornost v průběhu simulace byla zaměřena na elektroforézu a následně na formování vznikajícího Jouleova tepla. Byl určen vliv materiálových vlastností na maximální hodnotu teploty a její rozložení v objemech mikrokanálů. Tento program umožnil import 2D výkresů mikrostruktury vytvořené v aplikaci AutoCAD, který byl následně převeden do 3D modelu přístroje. K simulaci byla využita materiálová data z rozsáhlé databáze programu (diamantová mikrostruktura, pufir KCL, který vyplňoval mikrokanály). Tabulka č.1 ukazuje nejdůležitější materiálové parametry, na základě kterých byly provedeny počítačové simulace. Používaný program byl vyvinutý tak, aby bylo možné simulovat jevy vyskytující se v mikroměřítku, například tepelná vodivost byla vyjádřena v pW/μmK a ne v jednotkách SI.

Tab. 1 Materiálové parametry diamantu a pufru z databáze daného programu

Parametr	Jednotka	Diamant	Pufir KCL
Hustota	[kg/μm ³]	$3,515 \cdot 10^{-15}$	$1 \cdot 10^{-15}$
Tepelná vodivost	[pW/μmK]	$1,5 \cdot 10^9$	$6 \cdot 10^5$
Specifické teplo	[pJ/kgK]	$4,715 \cdot 10^{14}$	$4,1 \cdot 10^{15}$
Elektrická vodivost	[pS/μm]	$2 \cdot 10^2$	$1,288 \cdot 10^7$
Dielektrická konstanta	[–]	$5,7 \cdot 10^0$	$7,8 \cdot 10^1$
Viskozita	[kg/μm/s]	–	$1,002 \cdot 10^{-9}$

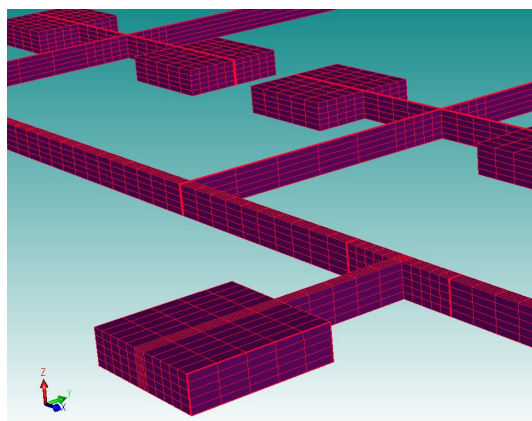
Sestavený model se skládal z mikrostruktury, pufru vyplňujícího mikrokanály a také krytu s otvory umožňujícími připojení elektrod. Geometrické rozměry modelu struktury jsou: hlavní kanál 50 x 250 x 23200 mikrometrů, spojovací kanál 200 x 250 x 1500 mikrometrů a

zásobníky o velikosti 1000 x 1000 x 250 mikrometrů. Na obrázku 26 jsou uvedeny příklady 3D modelů jednotlivých komponentů, ze kterých je sestaveno zařízení.



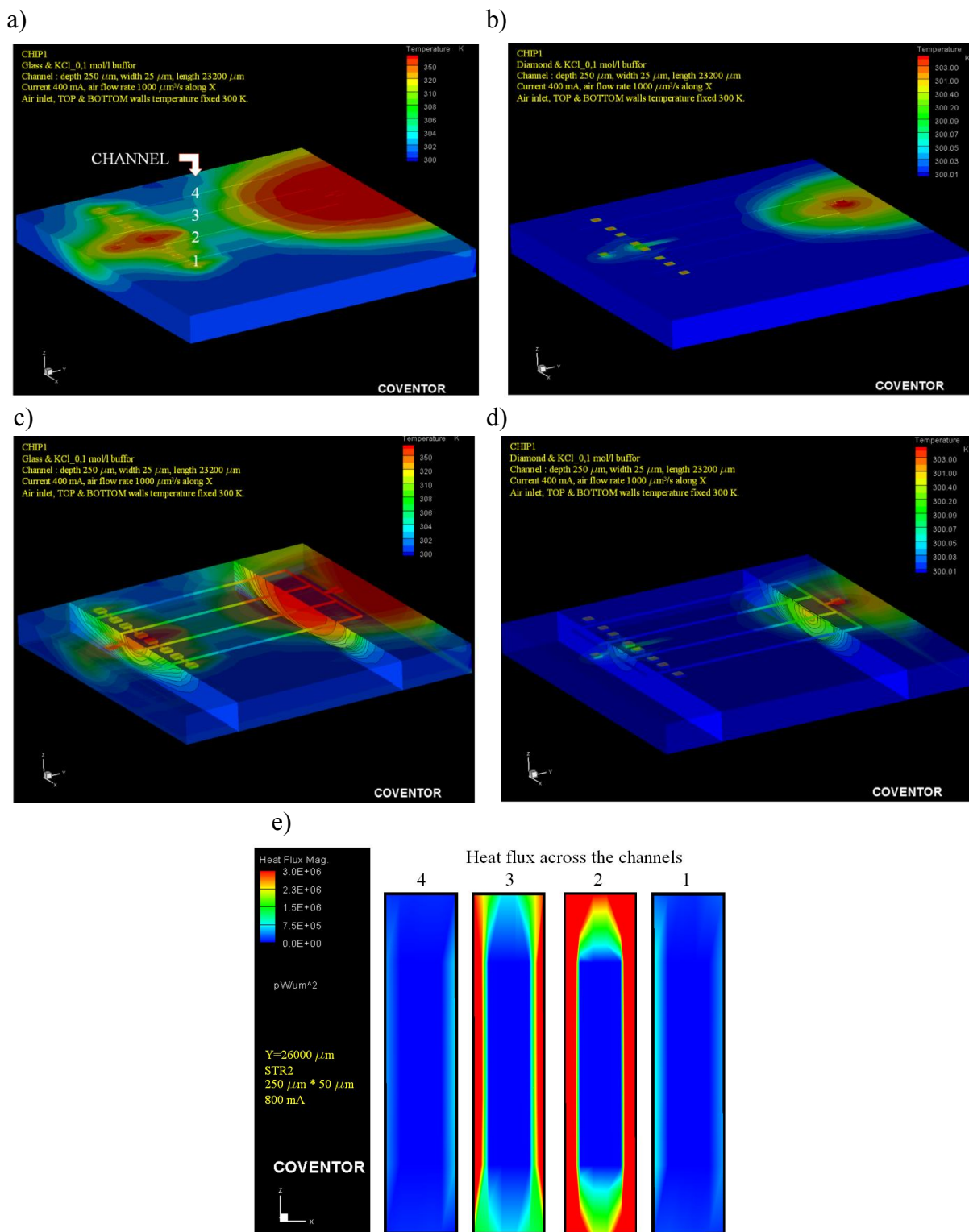
Obr. 26 Části modelů 3D zařízení: a) Diamantová mikrostruktura b) Vyplň mikrokánálů (pufír KCL) c) Diamantový kryt

Pro zjednodušení a urychlení simulace byla vybrána obdélníková síť objemových prvků („Manhattan Bricks“). Na obrázku 27 je uvedený příklad diskrétního modelu vyplněné mikrostruktury.



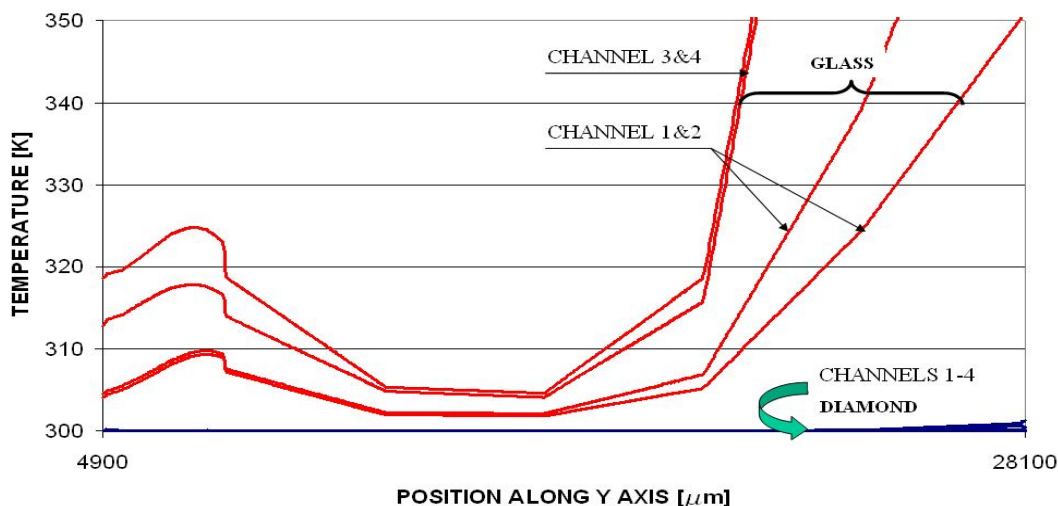
Obr. 27 Diskretizace tvaru mikrokánálů vyplněných pufírem KCL

Na obrázku 28 jsou uvedeny příklady z počítačových simulací zobrazující rozložení teploty v mikrostruktuře a v průřezech, které jsou způsobeny vznikem Jouleova tepla během procesu elektroforézy. Byly provedeny analýzy pro zpracovanou geometrii a proud procházející podél mikrokánálů o hodnotě 400 mA. Na obrázku 28 a), c) jsou uvedeny výsledky analýz pro sklo a na obrázku 28 b), d) jsou uvedeny výsledky pro diamant. Obrázek 28 e) ukazuje výsledek simulace rozložení tepla v jednotlivých mikrokánálech během procesu elektroforézy, při protékajícím proudu 800 mA.



Obr. 28 Ukázkové výsledky počítačových simulací: a) distribuce teploty ve struktuře ze skla b) distribuce teploty ve struktuře z diamantu c) distribuce teploty v průřezu skleněného mikročipu d) distribuce teploty v průřezu diamantového mikročipu e) distribuce tepelného toku podél mikrokanálů

Na obrázku 29 je uveden příklad výsledku počítačové simulace porovnávající teplotu podél mikrokanálů o identických mikrostrukturách vyrobených ze skla a diamantu v průběhu procesu elektroforézy za stejných podmínek.



Obr. 29 Porovnávací rozložení teploty pro mikrokanály ze skla a diamantu

Ve výsledcích z provedených simulací bylo pozorováno:

- místa zvýšeného lokálního ohřevu lokalizované při elektrodách (hlavně při anodě),
- nepříznivé jevy vzájemného ohřevu sousedních mikrokanálů způsobující zvýšenou teplotu vnitřních kanálů mikrostruktury,
- malé teplotní gradienty v příčných průřezích ve srovnání s velkými teplotními gradienty podél mikrokanálů,
- vysokou dynamiku tepelných jevů: přibližně po 1 vteřině toku proudu přes pufr se teplotní pole ve struktuře diamantu ustavilo prakticky na stejné úrovni.

Výsledky simulace funkčních parametrů mikročipů potvrdily stanovené předpoklady. Vysoký součinitel tepelné vodivosti diamantu umožní rychlý odvod Jouleova tepla z mikrokanálů k objemu diamantové struktury a následně na vnější stranu směrem k Peltierovu článku. Pomocí použitého materiálu, který má vysoký součinitel tepelné vodivosti, získáváme rovnoměrnost teploty a její snížení v průřezu a podél mikrokanálů ve srovnání s tradičními materiály používanými na mikročipy. Lze proto konstatovat, že použití diamantu k výrobě elektroforetických mikročipů se zdá být přiměřené a odůvodněné.

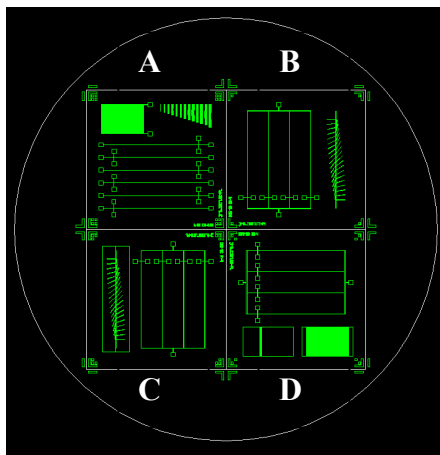
Po provedených analýzách a získání velmi nadějných výsledků předběžných zkoumání pomocí počítačových simulací, byly další kroky autora této práce směřovány k výrobě diamantového elektroforetického mikročipu.

4.2 Technologie vytvoření diamantového elektroforetického čipu

Diamant, z hlediska svých specifických vlastností, je materiálem těžko obrobitelným mechanicky a tepelně. Je to způsobeno hlavně jeho vysokou tvrdostí a křehkostí. K realizaci diamantového elektroforetického mikročipu byla využita metoda repliky [105, 106]. Metoda je použita k vyrobení zrcadlového tvaru požadované mikrostruktury z křemíku a následné depozice silné vrstvy polykrystalického diamantu. Dále následuje: laserové leštění povrchu nárůstu diamantové vrstvy a odstranění křemíkové matrice pomocí techniky mokrého leptání. Schematický popis metody je uveden v přehledu literární rešerše na obrázku 22. Metoda umožňuje vytvoření prakticky libovolných tvarů s velmi vysokou podobností s křemíkovou maticí závislou na použité technice a parametrech depozice diamantové vrstvy [107].

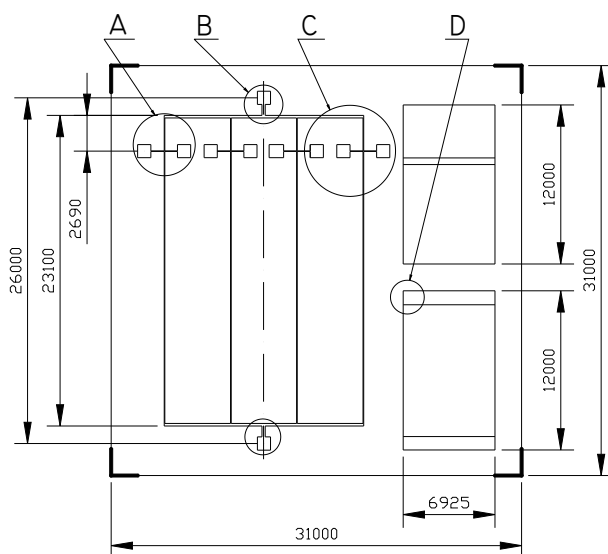
4.2.1 Vypracování a vyrobení prototypu křemíkové matrice

Křemíková matrice byla vyrobena na Instytucie Technik Elektronowych v Piasecznie, Polsko v rámci projektu „Diamantové mikroprůtokové zařízení pro genomiku a proteomiku“. K naprojektování a vyrobení matrice byla využita modifikovaná technologická linka integrovaného obvodu VLSI CMOS [8]. Křemíkové matrice, z hlediska časové náročnosti jednotlivých etap produkce, byly přizpůsobeny rozměrům plazmaticko – chemického reaktoru a také k povrchu dostupných křemíkových destiček, s cílem vyrobení co největšího počtu elementů během jednoho procesu. Maximální průměr vzorků, který lze umístit do reaktoru, byl 50 mm. Z toho důvodu byla k vytvoření křemíkových matic využita křemíková destička o průměru 100 mm, na kterou bylo možno umístit 4 čtvercové struktury 33 x 33 mm. Po dokončení výroby jednotlivých mikrokanálů byly vyrobeny masky k fotolitografii s použitím pozitivové emulze. Na obrázku 30 je uveden návrh modelu masky. Jednotlivé struktury se mezi sebou liší tvarem a geometrií mikrokanálů.

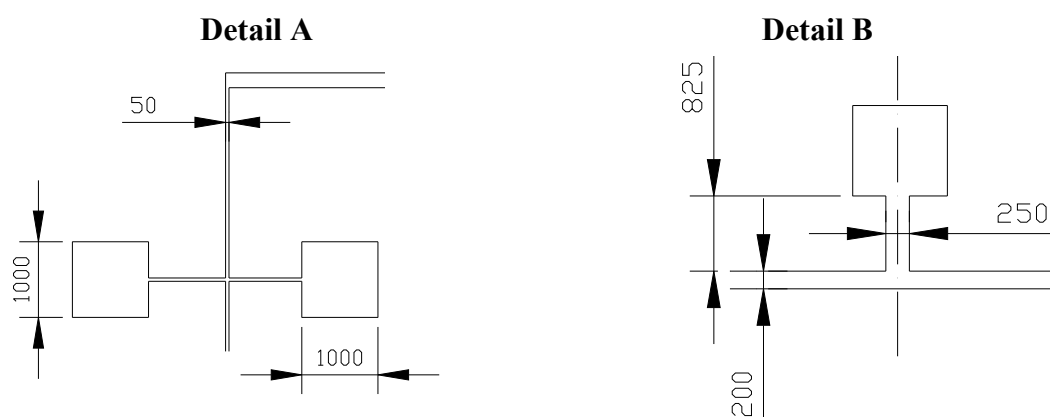


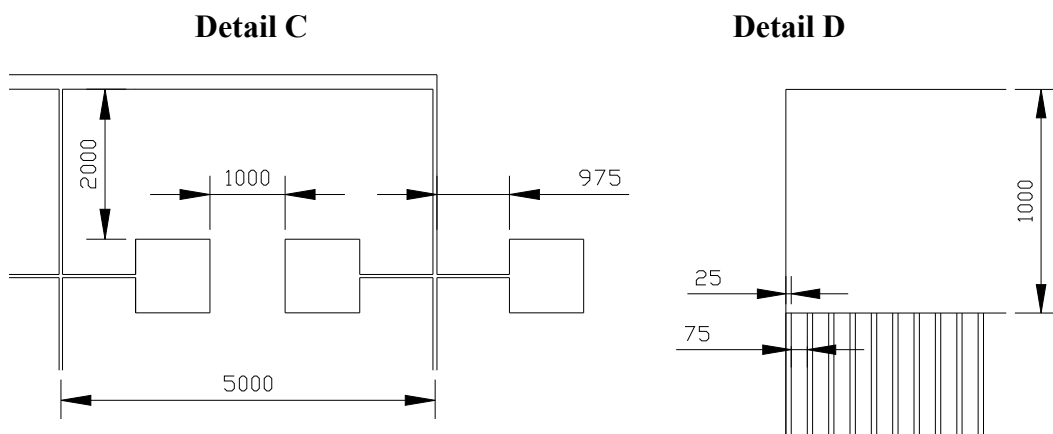
Obr. 30 Projekt vytvořené masky k fotolitografii

Vyrobené masky se nacházely vedle sebe, čipy B, C, D obsahovaly čtyři kanály o délce 23,2 mm a šířce v pořadí 10, 25, 50 μm . Bylo vytvořeno 10 mikronádrží o rozměrech 1 x 1 mm spojených mezi sebou mikrokanály, dva z nich zůstaly spojeny s vnějšími kanály, přes které se vyplňuje struktura a přivádí napětí. Zbývající nádrže sloužily k přivedení zkoumané látky do hlavního kanálu. Čip A obsahuje 6 rovnoběžných kanálů, ze kterých je každý vybaven čtyřmi nádržemi. Dvě vnější slouží k vyplnění a přivedení napětí k elektroforéze, zbývající dva slouží k přivedení zkoumané látky do hlavního kanálu. Na vyrobené masce jsou vidět zkušební struktury sloužící k hodnocení jednotlivých technologických procesů a také k určení hraničních rozměrů repliky diamantové vrstvy. Nacházejí se v pasivní části zařízení a nezúčastňují se práce. Zkušební struktura 1 se skládá z rovnoběžných kanálů o délce 1000 μm a šířce 25 μm rozdělených stěnami o šířce 75 μm , zatímco zkušební struktura 2 se skládá z rovnoběžných kanálů o délce 500 μm a šířce 25 μm rozdělených stěnami o šířce 75 μm . Na obrázcích 31, 32 je uveden přesný počítačový návrh matrice, který byl realizován pro čip D z hlediska provádění dalších zkoumání na této struktuře. Na snímcích jsou uvedeny vybrané hlavní rozměry struktury v μm .



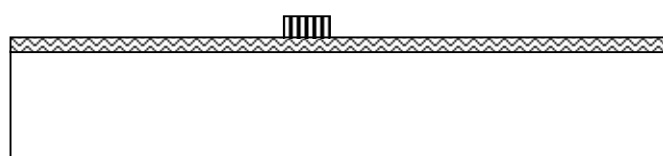
Obr. 31 Struktura s označenými místy zvětšených detailů



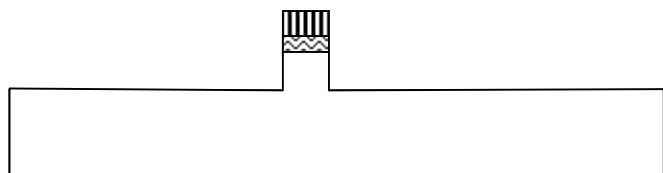


Obr. 32 Zvětšení fragmentů počítačového návrhu struktury zobrazující hlavní detaily sítě mikrokánálů, rozměry uvedeny v $[\mu\text{m}]$

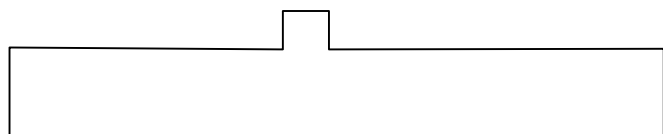
Technologie vytvoření křemíkové matrice je uvedena na obrázku 33. Zakoupené jednostranně leštěné monokrystalické křemíkové destičky o tloušťce 3 mm a o průměru 100 mm byly využity s cílem výroby formy repliky. Krystalografické uspořádání, druh vodivosti a rozsah rezistivity křemíkových destiček nebyl brán v úvahu, neboť neměl vliv na proces výroby.



a) Oxidace v difuzní peci, osazení podkladové vrstvy hliníkem Al, fotolitografie, odstranění Al mokrým leptáním



b) Leptání křemíkového substrátu – Boschův proces



c) Odstranění vrstev SiO_2 a také Al za pomoci mokrého leptání

Obr. 33 Technologie vytvoření křemíkové matrice

Proces vytvoření matrice se skládal z následujících etap:

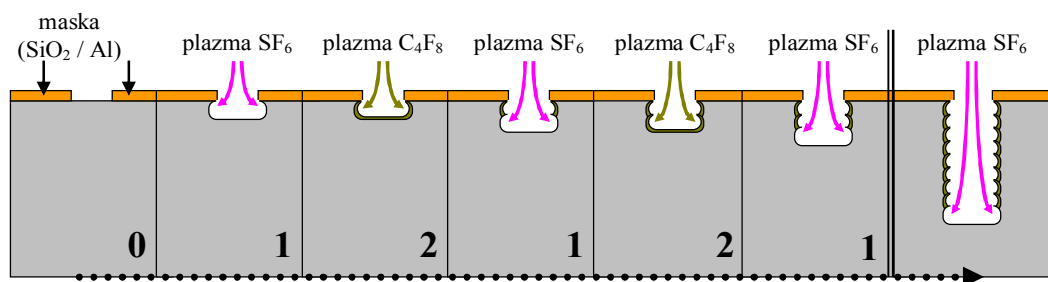
1. Oxidace
2. Osazení oceli
3. Fotolitografie
4. Plazmové leptání
5. Chemické leptání
6. Řezání jednotlivých struktur

Křemíkové destičky byly předběžně čištěny pomocí vstřikovací techniky s využitím odpovídajících procedur čištění při použití daných chemických činidel. Následně po vysušení rotační technikou byly bezprostředně přemístěny do kazety difúzní pece o teplotě 800 °C. V další etapě byly křemíkové vzorky zahřáty na teplotu 1000 °C po dobu 30 min v atmosféře dusíku a kyslíku o průtokových objemech 8/0,8 l/min. V dalších etapách bylo změněno složení atmosféry v peci prostřednictvím přivedených N₂, H₂, O₂ do komory pece v odpovídajícím množství v daném čase. Po vychladnutí křemíkových destiček byly naměřeny tloušťky získané vrstvy. Získaná tloušťka oxidační vrstvy byla 100 nm.

Proces depozice hliníku na substrát byl proveden pomocí zařízení Z650 značky Laybold Heraeus. Proces rozprašování byl realizován z terče vyrobeného z hliníku o čistotě větší než N5.0. Vyrobené vzorky byly umístěny na záporně polarizovaném rotačním stolku, který díky rotaci kolem osy určoval homogenitu získané vrstvy. Proces depozice vrstvy Al byl prováděn v atmosféře argonu při tlaku $2 \cdot 10^{-7}$ milibarů. Získaná vrstva hliníku měla tloušťku v rozmezí od 0,2 do 0,3 μm.

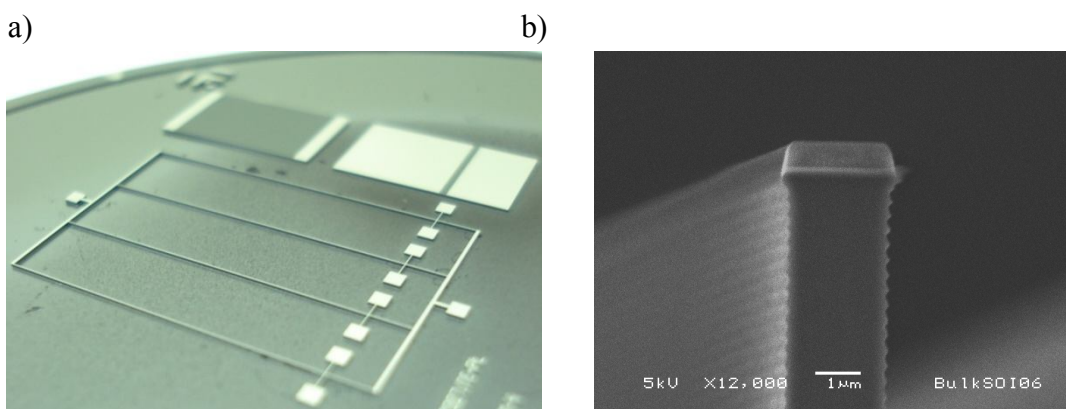
Proces fotolitografie byl realizován s využitím světlocitlivé emulze značky Shipley S1818. Vrstva emulze byla nanесena za pomoci odstřeďování emulze na povrch vzorku a následně byla vysušena zahřátím povrchu na teplotu 95 °C po dobu 1 minuty. Sušení způsobilo odpařování rozpouštědla z emulze a také zaručilo zamezení slepení křemíkové destičky s maskou během kontaktního nasvícování. Světlocitlivá emulze byla nasvícována lampou UV o výkonu 8 mW/cm² (8 – 10 sekund) přes skleněnou chromovou masku obsahující navržený tvar. Vyvolávání emulze bylo provedeno vstřikováním vyvolávače MF 321v průběhu 60 sekund. Pro vytvoření vyšší chemické odolnosti emulze byla provedena polymerizace se zahřátím v atmosféře dusíku o teplotě 100 °C po dobu 30 minut. Po nanесení tvaru mikrostruktury na povrch světlocitlivé emulze byla provedena mokrá fotolitografie, tzn. operace chemického leptání maskového fotorezistu a vrstvy Al. Vyvolaná emulze byla odstraněna z povrchu v plazmochemickém reaktoru s využitím kyslíkového plazmatu.

Na takto vyrobené křemíkové destičce kryté vrstvami SiO₂ a Al bylo provedeno hluboké plazmatické leptání v reaktoru Adixen, který využíval Boschův proces. Fáze leptání křemíku byla realizována v plazmatu SF₆, následně byl na povrchu deponován nestechiometrický polymer fluoro – uhlíku získaný z plazmatu C₄F₈. Cyklus leptání a deponování polymeru byl proveden vícekrát s cílem získání požadované hloubky. Na obrázku 34 je uveden schématický způsob výroby struktury pomocí Boschova procesu.



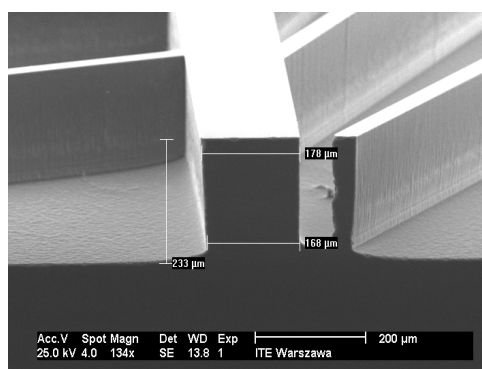
Obr. 34 Schéma sekvence vytvoření křemíkové struktury

Vícekrát opakované sekvence depozice polymeru a leptání křemíku umožnily, při předem určených technologických parametrech, získání tvaru o odchylce stěn $\pm 1^\circ$ od pravého úhlu (90°). Na obrázku 35 je zobrazena vytvořená matrice a SEM snímek získaného kanálu.



Obr. 35 Získané geometrie masky: a) celkový pohled na strukturu b) jednotlivé mikrokanály

V průběhu SEM analýzy příčných průřezů zkušebních struktur byly patrné lokální rozdíly v hloubkách leptání. Ve velkých oblastech byly zjišťovány hloubky větší, nicméně v oblastech o vyšší koncentraci maskovaných tvarů byly menší (obrázek 36).



Obr. 36 Snímek SEM zkušební struktury

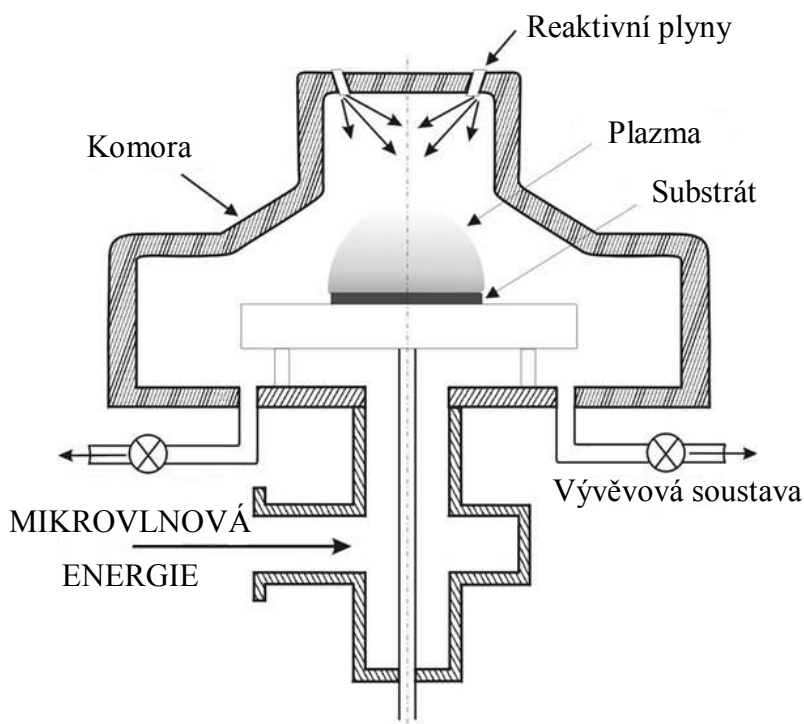
Po procesu plazmatického leptání křemíkové destičky byly provedeny operace spojené s odstraněním maskovacích vrstev Al a SiO_2 . Procesy byly zrealizovány ve speciálních

chemických sloučeninách kyselin, které nepůsobily leptání křemíku. Poslední operací bylo řezání křemíkových destiček na jednotlivé segmenty. Destičky byly chráněny pomocí tenké vrstvy laku nanesené na povrch s cílem zabránění mechanického poškození jemných mikrostruktur při přepravě.

4.2.2 Vytvoření polykrystalického diamantového čipu

Vyrobení polykrystalické diamantové struktury bylo zrealizováno ve fyzikálním ústavu Imena Prokhorova v Ruské akademii věd v Moskvě. Struktury byly vyrobeny depozicí vrstvy polykrystalického diamantu na křemíkových matricích, které byly následně vyleptány koncentrovanou směsí kyselin flourovodíkové a dusíkové naředěných destilovanou vodou v poměru 1:1:30. Proces vyžadoval zvláštní opatrnost z hlediska nebezpečí praskání struktury po odstranění křemíku. Praskání struktury bylo způsobeno hlavně mechanickým napětím, které mohlo vznikat mezi křemíkem a diamantem. Jedním z důvodů zodpovědných za tento jev je rozdíl součinitelů tepelných roztažností použitých materiálů.

Proces vzrůstu vrstvy polykrystalického diamantu byl proveden metodou chemického osazování z plynné fáze s použitím plazmy buzené mikrovlnami MP CVD (*ang. Microwave Plasma Chemical Vapour Deposition*) (system DF – 100) v atmosféře skládající se ze směsí plynů CH_4/H_2 . Na obrázku 37 je zobrazeno schéma plazmaticko – chemického reaktoru použitého při výrobě diamantového mikročipu.



Obr. 37 Schéma reaktoru k osazování vrstev polykrystalického diamantu MP CVD [108]

Zařízení využívalo plazma generované mikrovlnovou energií o frekvenci 2,45 GHz a výkonu 3,6 kW. Aplikovaná metoda zajišťovala vysokou hustotu plazmy – plazmatu, odpovídající koncentraci vodíku a uhlovodíkových radikálů. Získané diamantové destičky byly vyrobeny za následujících podmínek: chemické složení atmosféry – obsah metanu 2%, celkový průtok plynu 800 sccm, tlak v reakční komoře 87 Tr, teplota substrátu 820 °C. Obrázek 38 ukazuje reakční komoru, ve které byla vyrobena diamantová mikrostruktura. Před procesem osazení byl substrát předběžně nukleován zpracováním v ultrazvukové lázni v suspenzi detonačního nanodiamantu s etanolem. Rychlost vzrůstu deponované vrstvy polykrystalického diamantu na křemíkové matrici byla 1 $\mu\text{m/h}$.



Obr. 38 Náhled přístroje MP CVD model DF – 100 použitého k vytvoření polykrystalického diamantu

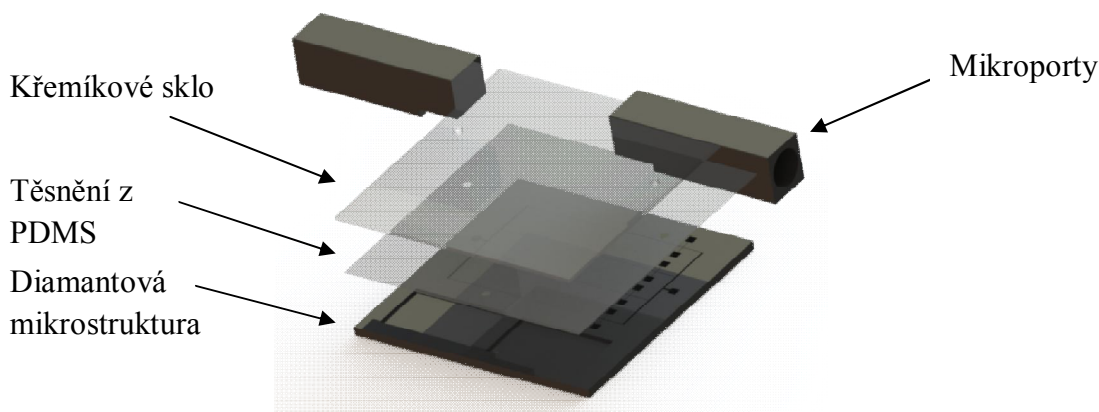
Po odstranění křemíkové matrice ve směsi kyselin HF – HNO₃, a také rozřezání pomocí laseru, vznikly hotové průhledné čipy o rozměrech 29,5 x 29,5 mm. Rovina krystalického vzrůstu diamantové vrstvy byla vyleštěna laserem. Touto operací vytvořená diamantová destička získala tloušťku 350 μm . Na obrázku 39 je zobrazena diamantová mikrostruktura vytvořená metodou MP CVD po procesu leptání křemíkové matrice.



Obr. 39 Vytvořená diamantová mikrostruktura

4.2.3 Navržení a výroba prototypového krytu struktury čipu

Uzavření diamantové mikrostruktury bylo zrealizováno pomocí křemíkového skla. Z hlediska požadavků na kryt při tomto druhu aplikací bylo nutné jeho výrobu ze skla o minimální tloušťce a vyhovujících optických vlastnostech. Po provedení předběžných experimentů k uzavření struktury bylo zvoleno křemíkové sklo o tloušťce 500 μm . Výroba krytu ze skla o menší tloušťce nebylo možné z důvodu jeho praskání v průběhu zhotovování otvorů pro mikroporty. Na obrázku 40 je zobrazen schematický způsob trvalého a těsného spojení krytu s mikrostrukturou prostřednictvím těsnění z PDMS (poly(dimetylosiloksan)).



Obr. 40 Schématické zobrazení spojení mikrostruktury s krytem

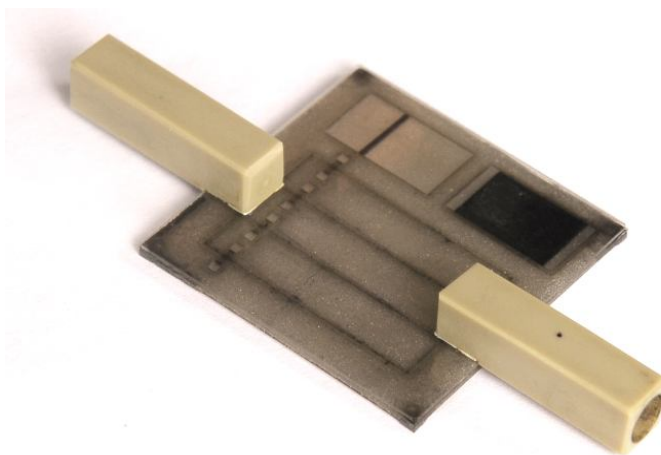
Po změření mikrostruktury pomocí optického mikroskopu byl zvolen konečný tvar pro křemíkový kryt s otvory umístěnými v ose hlavních mikronádrží. Po návrhu a výrobě mikroportů z PEEK (polyeteroeteroketon- polyetheretherketon) bylo provedeno jejich spojení s křemíkovým krytem s otvory o průměru 0,9 mm. Návrh mikroportů je umístěn v příloze 1 této práce. Připevnění mikroportů bylo provedeno pomocí adhezních kroužků. Zahřátím na teplotu 170°C po dobu jedné hodiny došlo k trvalému spojení mikroportu s krytem. Těsnost tohoto spojení byla zajištěna těsněním typu o-ring o rozměru 1x0,6 mm vyrobeného z Vitonu. Uzavření diamantové struktury bylo zrealizováno v laboratořích Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej Polskiej Akademii Nauk v Warszawie, Polsko.

Z důvodu zajištění těsného spojení diamantové mikrostruktury se skleněným krytem byla použita technika spojení pomocí elastomeru PDMS. Poly(dimetylosiloksan) je v mikrofluidických aplikacích běžně používaným materiálem díky svým specifickým vlastnostem. Je biokompatibilní, levný a průhledný v široké vlnové délce světla. Charakterizuje se také možnostmi spojení s různými materiály prostřednictvím aktivace povrchu [109]. Z toho důvodu bylo využito k této aplikaci PDMS Sylgard 184 značky Dow Corning, který je běžně ve formě monomeru a síťující látky v poměru 10:1. Spojení struktury s

krytem vyžadovalo časově náročný proces, který se skládal z několika etap. V první etapě byla vyrobena 70 μm membrána odstředováním 4 ml elastomeru na povrchu křemíkové destičky umístěné v centrifuze (technika spin coating). Tímto způsobem tříminutového odstředování vznikla rovnoměrná tloušťka na povrchu celé membrány. V další etapě došlo k sesítování elastomeru na povrchu křemíkové destičky. Tento proces vznikl v laboratorní sušičce při teplotě 80°C po dobu 120 minut s termocirkulací vzduchu. Po sesítování byl elastomer mechanicky odstraněn z křemíkové destičky a nanesen na elastickou folii.

V další etapě byla provedena aktivace povrchu membrány a diamantové mikrostruktury v kyslíkové plazmě. V průběhu aktivace dochází k oxidaci povrchu v důsledku rozbití kovalentních siloxanových vazeb ($\text{Si} - \text{O} - \text{Si}$) na povrchu PDMS, díky čemuž dochází ke vzniku silanolových vazeb OH. Je nutné neprodleně spojit aktivované povrchy, neboť rychle ztrácí hydrofobní vlastnosti při kontaktu s atmosférou. Po vyhřátí dochází k opětovnému trvalému spojení siloxanových vazeb [110,111]. Pro aktivaci povrchu byla využita plazmatická myčka značky Harrick Plasma za následujících podmínek: výkon generátoru RF 29,6 W, průtok kyslíku 80 cm^3/hod , tlak v komoře 580 mTr a čas 60 sekund. Spojení mikrostruktury s membránou bylo provedeno ručním přitlakem a následným zahřátím v laboratorní sušičce o teplotě 80 °C po dobu 120 minut.

Po vyrobení otvoru v membráně následoval další proces aktivace povrchu krytu a diamantové struktury s připevněným těsněním s výše uvedenými parametry. Po zakončení této etapy došlo ke spojení struktury s krytem za pomoci speciálně připraveného přístroje sloužícího k polohování. Po ručním přitlaku následoval poslední ohřev v sušičce o teplotě 80°C po dobu 120 minut. Získaná uzavřená struktura připravená k dalšímu zkoumání je zobrazena na obrázku 41.



Obr. 41 Diamantová mikrostruktura uzavřená krytem s připojenými mikroporty

4.3 Základní konstrukční požadavky měřící soustavy

Pro splnění technických požadavků sestavení měřící soustavy, bylo nutné provést rešerši, která je uvedena literární části této práce. Ze získaných poznatků, a na základě vlastních zkušeností, byly stanoveny výchozí technologicko – konstrukční požadavky na měřící soustavu.

Výběr materiálu mikročipu polykrystalického diamantu byl zvolen z hlediska:

- Největšího součinitele tepelné vodivosti ze známých materiálů,
- Průhlednosti v širokém pásmu, umožňující biochemické měření optickými metodami,
- Vysoké odolnosti proti elektrickému průrazu,
- Dobré chemické odolnosti,
- Dobré mechanické odolnosti.

Z hlediska specifických a dynamických elektroforetických procesů provedených v diamantovém mikročipu, měřící soustava musela splňovat a zajišťovat:

- Optimální tvar mikrostruktury a geometrie mikrokanálů.
- Projekt výroby mikroportů má zajišťovat jednoduché zapojení elektrod do hlavní nádrže.
- Projekt a návrh tvaru elektrod.
- Způsob výroby mikroportů musí splňovat tvar závislý na elektrokinetickém jevu na elektrodě, aby nedocházelo k zavzdušňování mikrokanálů.
- Jednoduché vyplňování a vypláchnutí zbytků pufrů pomocí destilované vody.
- Výběr elektroforetických pufrů.
- Systém chlazení musí rychle reagovat na dynamickou změnu teploty.
- Jako část sloužící k ohřevu a chlazení bude použit Peltierův článek s rozsahem teplot od -20 do 150°C.
- Projekt musí splňovat požadavky na minimální rozměr měřící hlavy.
- Vyrobená řídicí jednotka pro Peltierův článek, realizovaná s použitím regulátoru PID, musí zajišťovat plynulou a kontinuální stabilitu teploty během měření.
- Vybavení řídicí jednotky čtyřmi měřicími kanály (pro měření teploty) realizované pomocí rezistenčních snímačů Pt100.
- Konstrukce měřící soustavy musí zajišťovat propojení s počítačem pomocí RS485 s cílem řízení podmínek měření a možností plné archivace dat získaných v průběhu provedených experimentů.

- Konstrukce zařízení musí splňovat zapojení vysokonapětového zdroje, pracujícího v rozmezí od 0 do 5000 V.

4.4 Metodika zkoumání získané mikrostruktury

4.4.1 Zkoumání geometrie mikrostruktury a morfologie povrchu

4.4.1.1 Skenovací elektronová mikroskopie SEM

Skenovací elektronový mikroskop využívá detekce řady fyzických jevů, které jsou výsledkem skenování pozorovaného povrchu vzorku elektronovým svazkem a následným přetvářením digitálních signálů z jednotlivých detektorů. Jevy vyskytující se v kontaktu s elektronovým svazkem jsou: emise sekundárních elektronů, emise odražených elektronů, rozptyl svazku na vnitřních elektronových hladinách a také katodová luminiscence neboli emise fotonů. Intenzita získávaných signálů závisí na takových vlastnostech jako: topografie, chemické složení, krystalografická orientace [112].

Ke zkoumání byl využit skenovací elektronový mikroskop Hitachi S – 3000N. Analýza byla provedena na Institutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej v Polsku. Cílem zkoumání bylo geometrické zobrazování povrchu a tvaru mikrokanálů a mikrozásobníků. Tímto způsobem byl určen stupeň geometrické shody tvaru křemíkové matrice s diamantovým mikročipem. Sledovaná byla jak vyrobená mikrostruktura, tak strana krystalického nárůstu diamantu a také zkušební struktury. Obrazy byly získané při urychlujícím napětí 25 kV při využití různých druhů detektorů SE, BSE a také ESED.

4.4.1.2 Konfokální mikroskopie

Vyrobená struktura byla charakterizována pomocí profilometrie s využitím konfokálního skenovacího mikroskopu (CLSM) Nikon MA200. Základy konfokálního zobrazování byly navrženy a popsány Minským [113]. Osvětlený bod vzorku a jeho obraz se nachází v konfokálních rovinách neboli v ohnisku čočky. Vzbuzené světlo, které pochází zpoza ohniska, je eliminováno systémem clon. Využitím tohoto řešení získáváme obraz, který neobsahuje jiné složky, než je ohnisková rovina [113].

Cílem určení stupně geometrické shody křemíkové matrice a diamantového mikročipu byla naměřena změna geometrické struktury povrchu (SGP) analýzou základních parametrů drsnosti: Ra (střední aritmetická odchylka profilu drsnosti), Rz (maximální výška profilu drsnosti) a Rt (celková výška profilu drsnosti).

Tyto poměry byly provedeny uvnitř mikrokanálů a také na povrchu diamantového mikročipu. Byly určeny profily mikrokanálů a mikrozásobníků. Zkoumání bylo provedeno



na Institutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej v Polsku. K analýze byl využit univerzální mikroskop o inverzní optice Nikon MA 200 vybavený konfokálním systémem C1.

Byly zaznamenány obrazy v rozlišení 512 x 512 pixelů. Systém C1 umožnil pozorování a zobrazení příčných řezů mikrokanálů a mikrozásobníků. Ke skenování povrchů byl využit argonový laser o vlnové délce $\lambda=488$ nm. Obrazy byly zaznamenány pomocí programu EZ – C1. Použitím programu Mountains Map Premium byla provedena analýza získaných dat.

4.4.2 Analýza fyzikálně-chemických a mechanických vlastností

4.4.2.1 Fotoelektronová Spektroskopie XPS

Zkoumání povrchu metodou XPS (*X-ray Photoelectron Spectroscopy*) se provádí přes nasvětlení zkoumaného vzorku ve vakuu mono – energetickým svazkem měkkého rentgenového záření a také analýzou energie emitovaných elektronů vyražených z jeho povrchu. Získaná spektra jsou vynesena do grafu, na kterém je počet detekovaných elektronů (fotoelektronů) v závislosti na intervalu vazebné energie nebo v závislosti na jejich kinetické energii. Oblast emise fotoelektronů je velmi úzká, což má za následek využití této metody pouze ke zkoumání povrchu. Současně jsou z povrchu vzorku emitovány elektrony, což je způsobeno fotoelektrickým účinkem. Kinetická energie emitovaných elektronů je popsána podle vztahu:

$$KE = h\nu - BE - \Phi_s \quad (5)$$

kde: KE – kinetická energie elektronu

$h\nu$ – energie fotonu

BE – vazební energie z atomového orbitalu

Φ_s – výstupní práce pro uvolnění elektronu z povrchu

Energie vazeb může být považována za energetický rozdíl mezi počátečním a konečným stavem po opouštění atomu fotoelektronem. Protože existuje mnoho možných konečných stavů iontu, každý druh atomu má odpovídající kinetickou energii emitovaných elektronů.

V důsledku excitace atomů jsou souběžně emitovány Augerovy elektrony, které jsou součástí měřeného spektra. Vznikají v důsledku relaxace buzených iontů zbývajících po fotoemisi. Emise těchto elektronů se vyskytuje kolem 10^{-14} sekund po fotoelektrickém účinku. Jev rentgenové fluorescenční emise fotonu má malý vliv v daném rozsahu energie [114].

Zkoumání bylo provedeno v průběhu stáže na University of Alabama at Birmingham v USA. Vyrobená diamantová mikrostruktura byla charakterizovaná pomocí rentgenového

fotoelektronového spektroskopu XPS, PHI – 5000 Versaprobe. XPS spektra byla získána po předběžném čištění vzorku acetonem a následným leptáním pomocí iontového děla přímo v komoře zařízení. Získané spektrum zůstalo posunuté o 2kV ke kompenzaci povrchového náboje. Zkoumání mělo za cíl určení kvality a také přítomnosti jiných chemických vazeb, než diamantu.

4.4.2.2 Rentgenová mikroanalýza EDX

Přídavná zařízení k určení chemického složení v mikrooblastech metodou rentgenové mikroanalýzy jsou současně standardním vybavením skenovacích elektronových mikroskopů. EDX metoda (*ang. Energy Dispersive x-ray Spectroscopy*) slouží k analýze charakteristického rentgenového záření emitovaného v důsledku neelastického rozptylu elektronů na vnitřních elektronových hladinách prvků, ze kterých je složen zkoumaný materiál. EDX se tedy zabývá energetickou analýzou spektra emitovaného charakteristického rentgenového záření. Technika umožňuje určení chemického složení z plochy, z bodu nebo z linie zkoumaného vzorku. Tato metoda, zabývající se chemickým složením vzorku, spočívá na analýze charakteristického rentgenového záření vzbuzeného z hloubky několika μm [112].

K analýze byl využit skenovací elektronový mikroskop Tescan Vega XMU s EDX QUANTAX příslušenstvím společnosti Bruker k určení rentgenové mikroanalýzy. Zkoumání bylo provedeno na Katedře materiálů Technické univerzity v Liberci. Byla provedena analýza chemického složení povrchu a získána mapa rozložení prvků v označených oblastech. Zkoumání bylo provedeno v bodech a následně také v linii, která procházela mikrokanálem.

4.4.2.3 Smáčivost povrchu

Zkoumání úhlu smáčení povrchu bylo provedeno pomocí techniky popisu geometrie kapky. Metoda měření je založena na určení a označení geometrických tvarů kapky, která má běžně tvar vrchlíku nacházejícího se na zkoumaném povrchu. Geometrickými parametry jsou: výška vrchlíku h a poloměr styku kapky s povrchem vzorku r . Výška vrchlíku je určena vztahem:

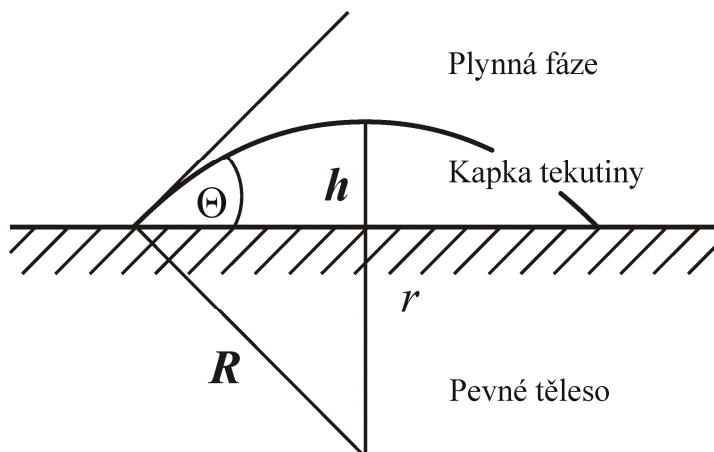
$$h = R \cdot (1 - \cos\Theta) \quad (6)$$

a poloměr styku kapky s povrchem (Obr. 42):

$$r = R \sin \Theta \quad (7)$$

Ze vztahů (6) a (7) lze určit úhel Θ : [115]

$$\Theta = \frac{2h}{r} \quad (8)$$



Obr. 42 Vyznačení úhlu smáčení z geometrie kapky [115]

Zkoumání bylo provedeno pomocí přístroje Krüss FM 40 na Institutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej v Polsku. Analýza smáčivosti povrchu pro deionizovanou vodu a také pro diiodmetan byla provedena metodou „sessiledrop“. Metoda spočívá v nanesení kapky o definovaném objemu 0,8 μl na zkoumaný vzorek pomocí mikropipety. Toto zařízení bylo vybaveno kamerou CCD a počítačovým softwarem, který určoval obrys zkoumané kapky na základě předdefinovaného tvaru elipsy. Diamantový vzorek byl zkoumán v 90-ti denních časových intervalech s cílem určení povrchových změn v čase. Každé měření bylo opakováno 5x. Uvedené výsledky jsou vyhodnoceny aritmetickým průměrem z provedených měření. Ze získaných výsledků byla vypočítána volná povrchová energie.

4.4.2.4 Volná povrchová energie

K výpočtu volné povrchové energie je využit model Owensa – Wendta, který je založen na teorii, že volná povrchová energie je složena ze dvou složek: polární a disperzní.

Rovnici určující SEP lze zapsat následujícím způsobem:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad (9)$$

kde: γ_s – volná povrchová energie (SEP)

γ_s^d – disperzní složka SEP

γ_s^p – polární složka SEP

Tento model uvažuje polární a disperzní složky volné povrchové energie pevných látek a je popsán rovnicemi:

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cdot \cos \Theta \quad (10)$$

$$\gamma_{SL} = \gamma_s + \gamma_L - 2(\gamma_s^d \gamma_L^d)^{0,5} - 2(\gamma_s^p \gamma_L^p)^{0,5} \quad (11)$$



kde: Θ – úhel smáčení měřený na reálném povrchu, γ_L – volná povrchová energie testovací tekutiny, γ_{SL} – označuje adhezi na fázovém rozhraní tekutina/pevná látka, index d, p značí v posloupnosti disperzní a polární složku volné povrchové energie materiálu a tekutiny.

Z rovnosti stran vztahů (10), (11) je získána následující rovnice (12):

$$\gamma_L \frac{1 + \cos \Theta}{2} = (\gamma_S^d \gamma_L^d)^{0,5} - (\gamma_S^p \gamma_L^p)^{0,5} \quad (12)$$

Po dosazení naměřených hodnot úhlu Θ pro dvě různé tekutiny o známých hodnotách γ_L^p, γ_L^d získáváme soustavu rovnic o dvou neznámých. Konečným výsledkem jsou jednotlivé složky SEP γ_S^p, γ_S^d [116].

Ke zkoumání byly použity dvě testovací tekutiny, deionizovaná voda a diiodometan. Podle [116], jsou tyto tekutiny charakterizovány SEP a také hodnotami disperzní a polární složky, uvedenými v Tab. 2.

Tab. 2 Hodnoty SEP a disperzní a polární složky testovacích tekutin

Testovací tekutina	γ_L [mJ/m ²]	γ_L^d [mJ/m ²]	γ_L^p [mJ/m ²]
Deionizovaná voda	72,8	21,8	51
Dijodometan	50,8	48,5	2,3

4.4.2.5 Tvrdost a Youngův modul pružnosti

Mechanické vlastnosti zkoumané destičky polykrystalického diamantu byly určeny pomocí měření tvrdosti a modulu pružnosti metodou nanoindentace s využitím přístroje G 200 NANO INSTRUMENTS. Zkoumání bylo provedeno na Instytutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej v Polsku. Měření mechanických vlastností vzorku bylo provedeno na jeho povrchu v deseti opakováních. Z měření byl vypočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Během měření byl používán Berkovičův indenter. Metoda nanoindentace je založena na penetraci indentoru o známé geometrii, na základě čehož je vypočítávána plocha vpichu funkcí průniku hrotu. Metoda také umožňuje stanovení Youngova modulu určením tuhosti z křivky odlehčení. Ze znalosti maximální síly a plochy vtisku lze vypočítat tvrdost podle vztahu (13):

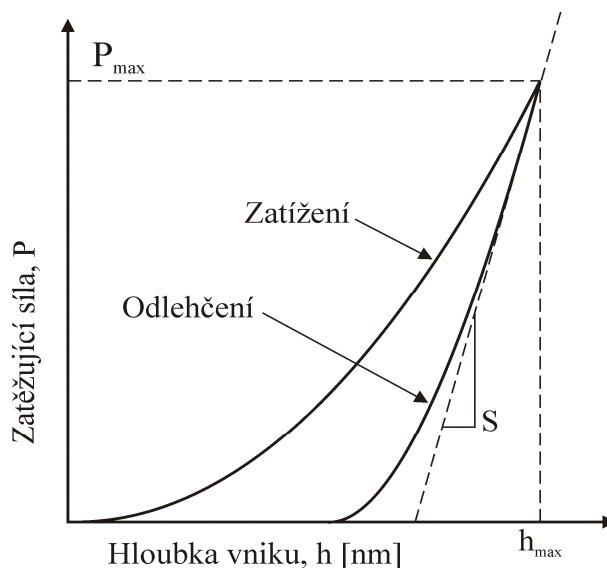
$$H = \frac{F_{\max}}{A} \quad (13)$$

kde: H – tvrdost

F_{\max} – maximální síla zatížení

A – plocha průřezu

Měření byla provedena použitím metody CSM (*Continuous Stiffness Measurment*). Je založena na kontinuálním poměru tuhosti funkce proniknutí indentoru v souladu s křivkou uvedenou na obrázku 43.



Obr. 43 Graf zatěžující síly ve funkci proniknutí indentoru

Toto měření je realizováno díky přidání dynamické oscilace do penetrátoru ve fázi zatížení vzorku. Zatěžující síla je o pár řádů větší od amplitudy oscilační síly. Výsledkem měření je změřená amplituda a oscilační fáze [117].

4.4.3 Analýza fázového složení

4.4.3.1 Ramanova spektroskopie

Metoda Ramanovy spektroskopie patří do skupiny nedestruktivních metod vyhodnocování. Je založena na poměru a registraci charakteristického rozptylu světla, které pochází nejčastěji z barevného laseru. Díky této technice získáváme informace o struktuře částic a zároveň o kvantitativní analýze obsahu jednotlivých prvků zkoumaného vzorku. Ramanovy spektrometry nové generace fungují na základě tzv. jevu rezonančního efektu Ramana, který je založený na tom, že frekvence primárního dopadajícího záření na vzorek se blíží charakteristické frekvenci buzeného záření, přičemž intenzita Ramanova záření intenzivně vzrůstá [112].

Zkoumání bylo provedeno na Katedrze Fyziky Molekularnej Politechniki Łódzkiej. Ramanova spektroskopie byla provedena pomocí disperzního spektrometru T – 64000 (Jobin-Yvon) vybaveného konfokálním mikroskopem Olympus BX-40. Ramanova spektra získána



pomocí svazku paprsků argonového laseru o vlnové délce buzení 514,5 nm a o výkonu přibližně 4 mW (výkon byl kontrolován na povrchu vzorku). Spektrální rozlišení v měření bylo přibližně $0,5 \text{ cm}^{-1}$, přičemž prostorové rozložení bylo kolem $5 \text{ }\mu\text{m}$. Měření bylo provedeno zaměřením svazku do několika charakteristických bodů diamantového vzorku: na povrchu, na hranice zrn mezi krystaly, v mikrokanálech a také na okrajích mikrokanálů a mikrozásobníků.

4.4.3.2 Rentgenová difrakce XRD

Rentgenová difraktometrie je nedestruktivní metodou určení chemického složení materiálu, jejíž princip spočívá ve využití jevu rentgenové difrakce paprsku, a také na analýze získaných difraktogramů. Každá testovaná látka dává charakteristický difrakční obrazec, bez ohledu na to, zda je složkou ve směsi nebo je v čisté formě. Tato metoda využívá Braggova zákona, ze kterého se určuje mezirovinová vzdálenost d_{hkl} .

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\Theta \quad (14)$$

kde: n – přirozené číslo určující následné mřížkové plochy

λ – je délka vlny použitého záření

d_{hkl} – mezirovinová vzdálenost

$\sin\Theta$ – Braggův úhel

Hodnoty mezirovinových vzdáleností charakterizují krystalickou mřížku, neboli umožňují identifikaci zkoumané fáze [118].

Zkoumání XRD bylo provedeno na Institutu Inżynierii Materiałowej Politechniki Łódzkiej v Polsku. Fázové složení zkoumané diamantové destičky bylo stanoveno pomocí rentgenového difraktometru Siemens D – 500. Difraktometrické zkoumání bylo provedeno v rozsahu úhlu 2Θ od 40° do 160° s použitím monochromatického záření $\text{CoK}\alpha$ o vlnové délce $\lambda = 1,79 \text{ Å}$. Získaný difraktogram byl zpracován s využitím dostupného softwaru X – Rayan použitím krystalografické databáze ICDD (*ang. International Centre for Data Diffraction*). Karta PDF 00 – 006 – 0675 je uvedena v příloze číslo 2 této práce.

4.4.4 Analýza tepelných vlastností

Zkoumání tepelné vodivosti λ bylo provedeno pomocí modifikované laserové impulsní metody LFA (*LFA – ang. Laser Flash Analyzer*) s využitím zařízení LFA 457 MicroFlashTM společnosti NETZSCH. Měření bylo provedeno na Katedrze Chemii Nieorganicznej Akademii Górniczo – Hutniczej w Krakowie, Polsko.

Obecný úvod do této metody uvádí Parker [119] a Min [102] a jejich kolektiv. Tato metoda umožňuje přímé měření tepelné difuzivity α . Nicméně, většina moderních systémů je také schopna měřit tepelnou kapacitu c_p . Známe-li hustotu ρ zkoumaného materiálu, jeho tepelnou vodivost λ je možné vypočítat podle vztahu:

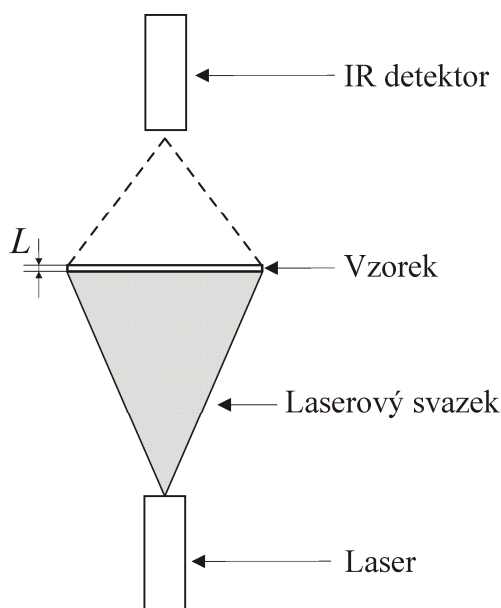
$$\lambda(T) = \rho(T)c_p(T)\alpha(T) \quad (15)$$

kde: λ – tepelná vodivost

ρ – hustota materiálu

α – tepelná difuzivita

Obrázek 44 znázorňuje schéma typické konfigurace pro měření pomocí pulzní laserové metody. Ve standardních měřeních je obvykle malá část spodní strany vzorku, který je ve tvaru disku nebo čtverce, ohřívána krátkým pulzem energie laseru. Detektor infračerveného záření IR měří nárůst teploty na opačné straně zkoumaného povrchu vzorku ve funkci času.



Obr. 44 Schéma typického uspořádání zařízení pro měření tepelné vodivosti ve směru kolmém na povrch

4.4.5 Analýza optických vlastností - spektrofotometrie UV-VIS-IR

Spektrofotometrie UV-VIS-NIR je výzkumná technika, při které se pro účely měření využívá energetických přechodů, ke kterým dochází v molekulách v důsledku absorpce elektromagnetického záření ležícího v rozsahu: blízkého ultrafialového záření (UV 200 nm – 380 nm), viditelného záření (VIS 380 nm – 780 nm) a blízkého infračerveného záření (NIR 780nm – 3300nm). Metoda je založena na kvantitativní měření absorpce, emise anebo odrazu světla. Záření o určité intenzitě dopadající na vzorek je částečně odražené, rozptýlené,

pohlčené, a jen část prochází zkušebním materiálem. Tento vztah je reprezentován rovnicí [121]:

$$I_o = I_r + I_p + I_t \quad (16)$$

kde: I_o – intenzita svazku záření

I_r – intenzita svazku rozptýleného a odraženého

I_p – intenzita svazku pohlčeného

I_t – intenzita svazku procházejícího vzorkem

Absorpční spektra zkoumané vrstvy polykrytalického diamantu v rozsahu UV-VIS-NIR byla získána pomocí dvojitého svazku s využitím spektrofotometru Cary 5000 (Varian Inc). Aby bylo možné určit vliv jevů rozptylu svazku (od povrchu vzorku) na absorpční spektra, byla spektra provedena s použitím integrující koule. Zkoumání bylo provedeno na Katedrze Fyziky Molekularnej Politechniki Łódzkiej, Polsko.

4.4.6 Měření rozložení teploty v diamantovém mikročipu

Pro měření rozložení teploty byla použita termovizní zobrazovací technika. Tato metoda spočívá v záznamu teploty v každém bodě zkoumaného povrchu díky detekci a zpracování signálu záření z infračervené oblasti. Termovizní zkoumání jsou založena na měření elektromagnetických vln emitovaných zkoumaným materiálem. Infračervené termovizní kamery využívají tuto vlastnost, že každý objekt v teplotě nad $-273,15$ °C vyzařuje energii. Hodnota emitované energie se mění v závislosti na teplotě objektu. Tato vlastnost umožňuje měření teploty zejména v infračervené oblasti.

Tepelný tok záření dopadajícího do infračerveného detektoru se skládá z [122]:

- toku emitovaného od zkoumaného objektu:

$$\phi_{ob} = \varepsilon_{\lambda}^{ob}(T_{ob})\tau_{\lambda}^{atm}(T_{atm})R_{\lambda}^{ob}(T_{ob}), \quad (17)$$

- toku emitovaného přes okolí a odraženého od zkoumaného objektu:

$$\phi_{odb} = [1 - \varepsilon_{\lambda}^{ob}(T_o)]\varepsilon_{\lambda}^o(T_o)\tau_{\lambda}^{atm}(T_{atm})R_{\lambda}^o(T_o),$$

- toku emitovaného přes atmosféru:

$$\phi_{atm} = [1 - \tau_{\lambda}^{atm}(T_{atm})]R_{\lambda}^{atm}(T_{atm}),$$

kde: ε_k – monochromatický koeficient emisivity

ϕ – hustota tepelného toku záření W/m^2

τ_{λ} – monochromatický součinitel propustnosti (transmise)

R_{λ} – intenzita monochromatického záření W/m^2

T – teplota K



λ – délka vlny záření μm

atm – atmosféra

o – okolí

ob – objekt

odb – odraz

Ke zkoumání byly použity dvě termovizní kamery. Prvním zařízením byla nechlazená mikrobolometrická VarioCam Hi Res společnosti Jenoptik pracující v interferenčním spektrálním rozsahu $7,5 - 14 \mu\text{m}$ (dlouhé vlnové délky, LWIR ang. *Long – Wavelength Infrared*). Druhým zkušebním zařízením byla kamera Titanium společnosti CEDIP Infrared Systems (v současné době FLIR), která používá chlazený fotonový detektor pracující v infračerveném spektrálním rozsahu $3 - 5 \mu\text{m}$ (střední vlnové délky, MWIR ang. *Mid – Wavelength Infrared*).

Bolometrické detektory se započítávají do skupiny termálních detektorů. Jejich princip je založen na změně rezistence R detektoru funkcí změny teploty T , $R=f(T)$. Detektory tohoto typu absorbují energie dopadajícího infračerveného záření scény a ohřívají se jeho vlivem. Hodnota rezistence R je měřena kamerou jednotlivě pro každý mikrobolometr v matici a následně jsou tyto hodnoty přepočítány na teplotu. Fotonové detektory se vyrábí z příslušných polovodičů, které pohlcují fotony z infračervené oblasti. Pohlčené fotony vytvářejí volné elektrony, které způsobují vznik proudu procházejícího detektorem. Tento jev je využíván k měření intenzity infračerveného záření [123].

V průběhu realizace měření bylo zapotřebí určit hodnotu koeficientu emisivity zkoumaných povrchů. Z toho důvodu byla použita metoda s referenčním tělem, která je založena na využití těla o známé hodnotě emisivity ε_r . V průběhu odhadu emisivity zkoumaných povrchů o teplotě T_0 je vzorek kalibrován pomocí referenčního těla, které se zahřívá na stejnou teplotu T_0 . Nezbytnou podmínkou této metody je, aby se povrchy obou těl nacházely v těsné blízkosti tak, aby bylo dosaženo stejného vlivu záření scény. Následně bylo provedeno měření hodnoty teploty T_r referenčního povrchu použitím kamery s nastaveným koeficientem emisivity ε_r . V další etapě při použití kamery byla naměřena teplota zkoumaného povrchu se současnou volbou vhodného koeficientu emisivity ε_0 tak, aby získaná teplota o hodnotě T_0 byla rovna referenční teplotě T_r . Tímto způsobem byla vyhodnocována hodnota koeficientu emisivity ε_0 zkoumaného povrchu. Pro změření hodnoty koeficientu emisivity je možné rovněž využít rozšířenou verzi této metody s využitím vztahů (20) a (21), které umožňují výpočet ε_0 na

základě naměřených hodnot emitance z obou povrchů pomocí termovizní kamery. Emitance se vyjadřuje rovnicemi:

$$M_1 = \varepsilon_0 M_c(T_0) + (1 - \varepsilon_0) M_{ot}, \quad (20)$$

$$M_2 = \varepsilon_r M_c(T_0) + (1 - \varepsilon_r) M_{ot}, \quad (21)$$

kde: M_1 – hodnota emitance těla o neznámé emisivitě

M_2 – hodnota emitance těla o známé emisivitě

M_{ot} – hodnota emitance okolí

$M_c(T_0)$ – hodnota emitance modelu absolutně černého tělesa o teplotě zkoumaného objektu (T_0)

ε_r – hodnota emisivity referenčního povrchu (známá hodnota)

ε_0 – hodnota emisivity zkoumaného povrchu (požadovaná hodnota)

T_0 – hodnota teploty zkoumaného a referenčního povrchu

Z rovnic (20), (21) je možné určit požadovanou hodnotu emisivity ε_0 (22) [123]:

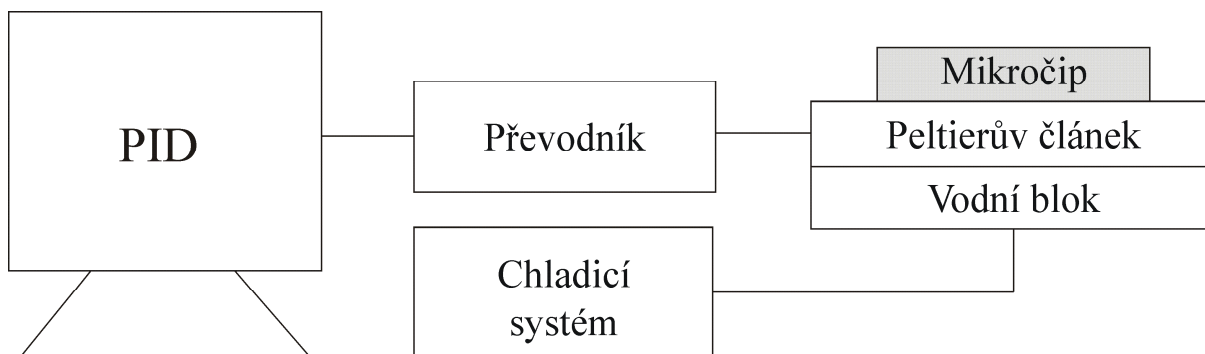
$$\varepsilon_0 = \varepsilon_r \frac{M_1 - M_{ot}}{M_2 - M_{ot}} \quad (22)$$

Zkoumání bylo provedeno na Institutu Elektroniki Politechniki Łódzkiej v oddělení Układów Elektronicznych i Termografii, Polsko. Měření bylo prováděno pomocí dvou infračervených kamer výše popsaných. Všechny provedené testy byly prováděny za stejných klimatických podmínek. Místnost byla zajištěna stabilizovanou teplotou v rozmezí 22 – 23 ° C, relativní vlhkost vzduchu se pohybovala okolo 50%. Zkoumaný mikročip byl oddělen od zdroje světla, tepla a turbulence vzduchu vyrobením speciálního krytu pro měřicí systém. Pro ověření věrohodnosti a opakovatelnosti získaných výsledků byla provedena kalibrace. Kamera Titanium byla před měřením zkalibrována výrobcem, přičemž v případě kamery VarioCam byla využita kalibrace provedená v průběhu výroby kamery. Počítačová analýza termovizních obrazů byla provedena pomocí odborných softwarů dedikovaných přímo k oběma termovizním kamerám. Výsledky z tohoto měření jsou prezentovány pomocí záznamu z termogramů pracujících na principu vizualizace rozložení teploty zkoumaných povrchů. Pro zjednodušení rozlišování hodnot teploty na termogramech bylo použito palety „rainbow”, kdy linearita byla individuálně doladěna pro každý termogram s cílem předložení co nejpřesnějších teplotních rozdílů. Chyby měření vyplývají z přesnosti použitých infračervených kamer ($\pm 1,5$ K pro kameru VarioCam, ± 1 K pro kameru Titanium). Jako referenční tělo byl použit černý pásek se známou emisivitou 0,95. Roztok pufru TRIS vyplňující mikrokanály byl zvolen na základě literární rešerše [124 – 127].

5. Výsledky zkoumání

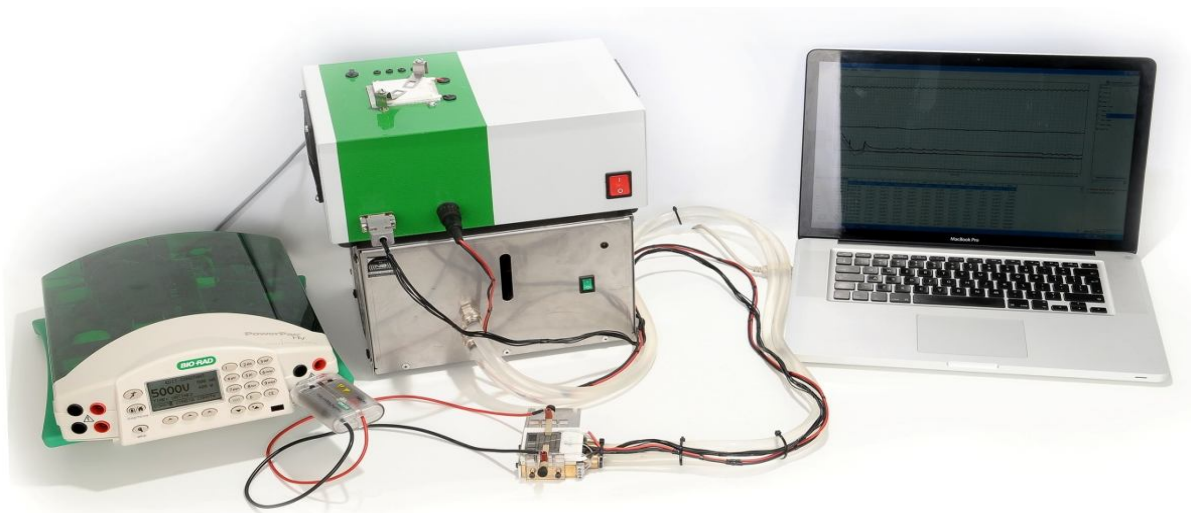
5.1 Měřicí soustava k provádění elektroforetických rozvodů

Pro realizaci navržených úkolů byla vyprojektována a postavena měřicí soustava k provedení mikročipové elektroforézy se současným chlazením Peltierovým článkem. Schéma zařízení je znázorněno na obrázku 45.



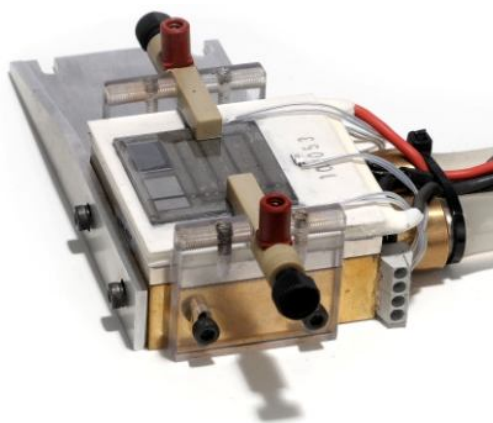
Obr. 45 Schéma sestaveného zařízení

Vyrobená soustava se skládá z Peltierova článku, vodního systému chlazení, ovládacího modulu, systému měření a záznamu teploty s galvanicky izolovaným konektorem RS 485. Převodník se skládá ze zdroje ovládacího napájení článku proudem a je vybaven čtyřmi kanály pro měření teploty pomocí rezistenčních snímačů Pt100. Jeden kanál je využíván k měření teploty povrchu článku, na základě čehož následuje regulace teploty. Zbývající kanály slouží k měření a záznamu teploty v libovolném místě na povrchu článku. Zařízení je spojené s počítačem, který plní funkci PID regulátoru (proporcionální – integrační – derivační), který umožňuje přesné ovládání teplot a také zaznamenává cykly změn teploty za čas. Zařízení bylo vybaveno vodním systémem chlazení Peltierova článku s cílem minimalizace velikosti měřicí hlavy. Teplotní rozsah, ve kterém zařízení může pracovat je od -20 do 150°C. Navíc toto zařízení doplňuje vysokonapěťový zdroj sloužící k provedení elektroforetických rozvodů. Konečným výsledkem této práce je soustava určená k provedení mikročipové elektroforézy, která je chlazená za pomoci Peltierova článku (obrázek 46).



Obr. 46 Celkový náhled na testovací soustavu

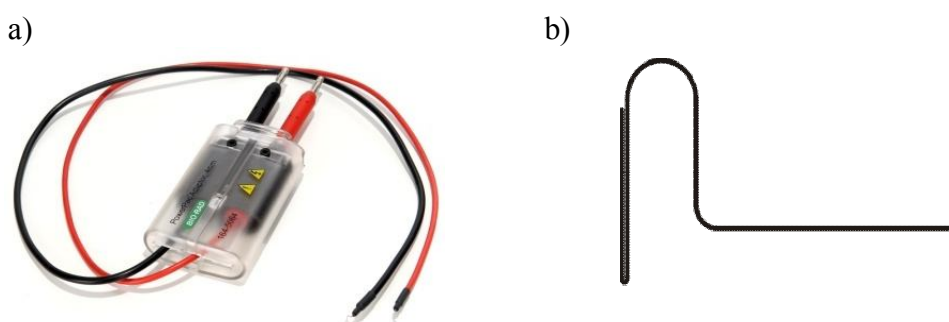
Měřicí hlava soustavy se skládá z vodou chlazeného bloku vyrobeného z mosazi a také z Peltierova článku připevněného k bloku pomocí tepelně vodivé pasty zvyšující odvod tepla. Na povrchu článku se nacházejí 3 teplotní snímače a také jeden snímač k zaznamenávání změn teploty bloku. Měřicí hlava je vybavena bočními drážky vyrobenými z polykarbonátu (PC), které slouží k umístění a upevnění mikročipu na povrch termočlánku. Na obrázku 47 je zobrazena měřicí hlava zkušební soustavy s mikročipem s připojenými mikroporty.



Obr. 47 Měřicí hlava zkušební soustavy

Vyplňování a vyplachování mikrokanálů mikrostruktury bylo realizováno prostřednictvím speciálně vyrobených teflonových kapilár o průměru 1/16" x 0,75 mm zakončených mikroportem se závitem UNC 6 – 32, tvořícím těsné spojení mikroportu s mikročipem. Vyplňování struktury probíhalo vytvořením podtlaku v mikrokanálu pomocí laboratorní injekční stříkačky. Použití teflonu v tomto typu aplikace bylo dáno jeho pružností a flexibilitou, což značně usnadnilo vyplňování a vyplachování mikrokanálu.

Další etapou realizace zkoumání byla výroba elektrod. K tomuto účelu byl využit platinový drát o čistotě 99,9 % a o průměru 0,5 mm. K němu byly připojeny měkkým pájením vysokonapěťové kabely se silikonovou izolací o jmenovitém napětí 6 kV. Během pozorování se ukázalo, že tvar a umístění elektrod má velký význam pro výzkum. V případě elektrod připojených v ose mikrokanálu vznikaly na jejím povrchu plynové bubliny. Z důvodu elektroosmotického pohybu se tyto bubliny přemísťovaly do struktury, což způsobovalo přerušení elektrického obvodu. Tento efekt se přisuzuje k elektrodotovým kinetickým jevům. Po optimalizaci tvarů a umístění elektrod v mikroportech byly plynové bubliny vypouštěny do atmosféry. Na obrázku 48 je uveden tvar elektrod.



Obr. 48 Vysokonapěťové elektrody: a) připojení ke zdroji pomocí adapteru, b) tvar platinové elektrody

Soustava byla vybavena vysokonapěťovým zdrojem PowerPacTM HV společnosti BIO-RAD uvedeným na obrázku 49. Konstrukce zdroje umožnila přívod konstantního napětí ke zkoumanému mikročipu, proudu nebo výkonu v závislosti na požadavku a druhu testování. Přístroj umožňoval nastavení jednoho z elektrických parametrů jako ovládajícího, který byl udržován na nastavené hodnotě. Tento napájecí zdroj pracoval v napěťovém rozsahu od 20 do 5000 V.

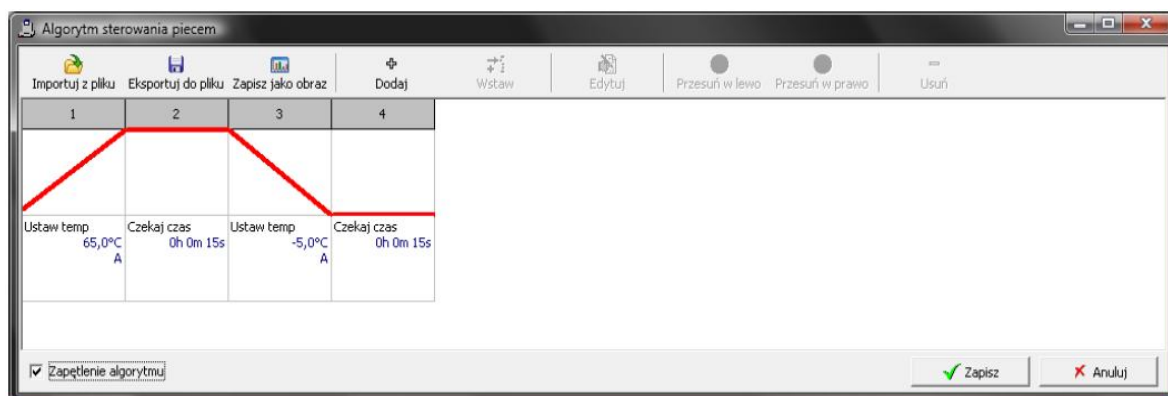


Obr. 49 Vysokonapěťový zdroj

Počítačový program plní funkci PID regulátoru, který umožňuje řízení ve formě topné – ochlazující jednotky v rozmezí -30 až 150°C. Software byl naprogramován tak, že uživatel měl možnost kalibrace parametrů PID regulátoru pro zvolené teploty. V průběhu měření jsou zaznamenávány parametry popsané níže, které jsou uloženy jako datové soubory *.plr, *.pld, nebo mohou být exportovány jako *.txt data:

- Čas – zkušební doba,
- A, B, C, D, – teplota určeného kanálu,
- TO – teplota okolí,
- Tin – teplota uvnitř pouzdra,
- Upltr – napětí Peltierova článku,
- Uzas – napájecí napětí Peltierova článku,
- TZ – nastavená teplota,
- Ster – procentové ovládání (kontrolní míra).

Řídící jednotka je schopna plnit úkoly nebo algoritmy (seznamy kroků), které realizuje program během práce zařízení. Na obrázku 50 je uvedeno okno programu s uvedenými parametry práce přístroje. Pokud naprogramovaný algoritmus dosáhne konce měření, automaticky se zastaví. Je zde také možnost zvolit “smyčku algoritmu“, který opakuje vytvořený program. V tomto případě je nutné ho individuálně zastavit. Algoritmy je možné exportovat, importovat a uložit jako obrázek.



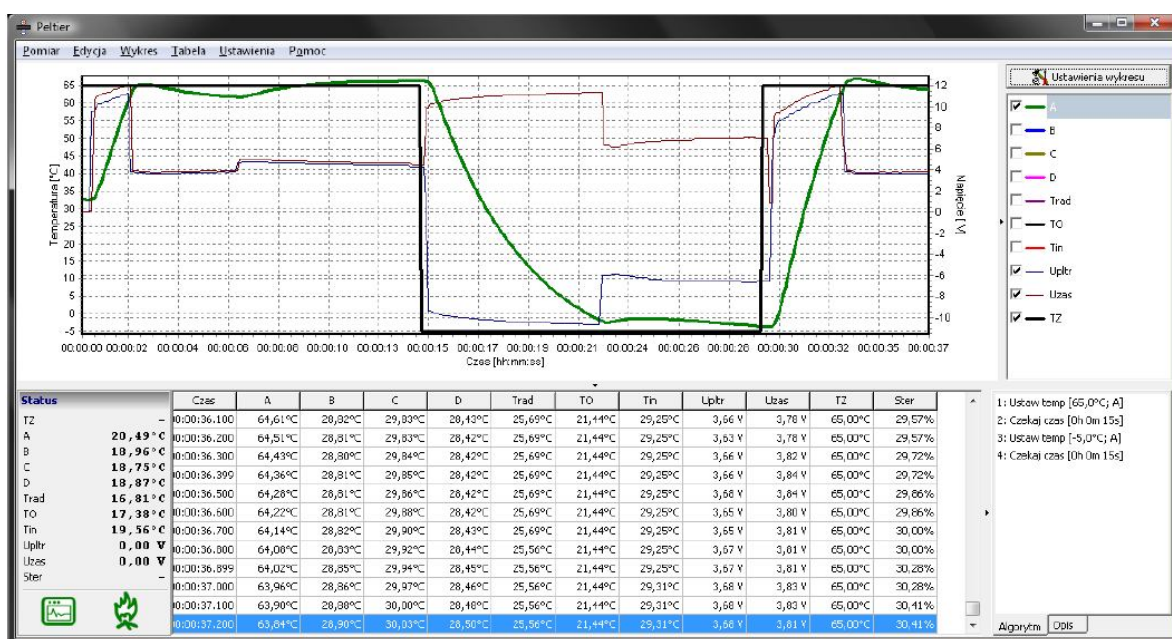
Obr. 50 Příkazy algoritmu

Realizované druhy příkazů algoritmu:

- Nastavte teplotu – stanoví požadovanou teplotu a rychlost vytápění / chlazení. Navíc má systém možnost výběru kanálu, ze kterého budou data zpracovávána regulátorem PID.
- Čekej čas – program čeká, až se ukončí určený čas.

- Čekej do teploty – program čeká do stanovené podmínky (teplota \leq hodnota). Po splnění tohoto vztahu se program přesune do dalšího kroku v algoritmu.
- Čekej čas anebo do teploty – je kombinace dvou posledních režimů, která je založena na spojení „čekej do teploty.“ a „čekej čas“. Program čeká, dokud je podmínka nesplněna, ale ne déle než stanovenou dobu.

Na obrázku 51 je uvedeno hlavní okno programu, ve kterém jsou v průběhu měření prezentovány všechny získané výsledky různých parametrů v reálném čase. Software má několik funkcí, které usnadňují používání těchto konfiguračních grafů (zoom, editace, zobrazení grafů apod.) a spolehlivé nastavení měření (ukládání, čas vzorkování, filtry, apod.).



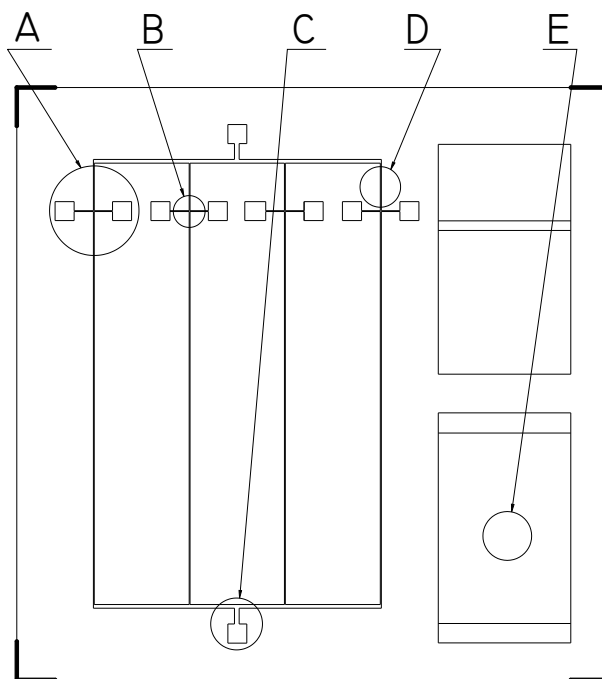
Obr. 51 Hlavní okno ovládání programu

5.2 Výsledky studia mikrostruktury a morfologie povrchu

5.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie SEM

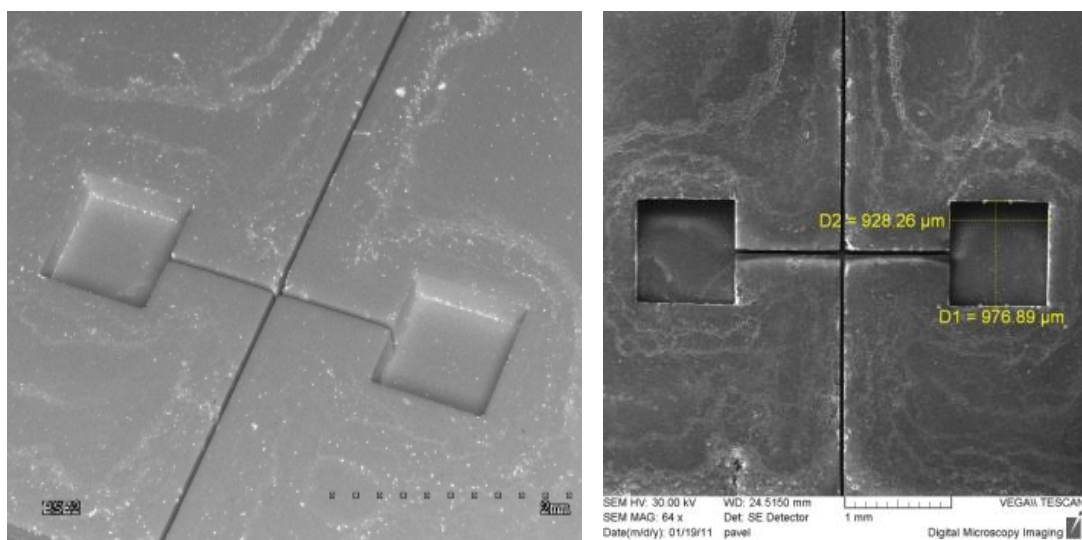
Pomocí SEM byly analyzovány a určeny geometrické rozměry (šířka) mikrokanálů a také definována struktura krystalického vzrůstu diamantu. Dále byla zkoumána zkušební struktura pro určení minimálních rozměrů křemíkové matrice, při kterých je možné vyrobení (je možná replika křemíku diamantem) diamantové struktury (diamantová nukleace mezi dvěma úzkými mikrokanály).

Na obrázku 52 je uvedeno schéma zařízení s označenými vybranými místy pro SEM analýzu. Mikrostrukturu tohoto zařízení je možno rozdělit na: hlavní kanály (čtyři vertikální kanály), spojovací kanály (dva horizontální) a dále na mikrozásobníky sloužící pro zavedení zkoumaných materiálů a pro připojení elektrod.

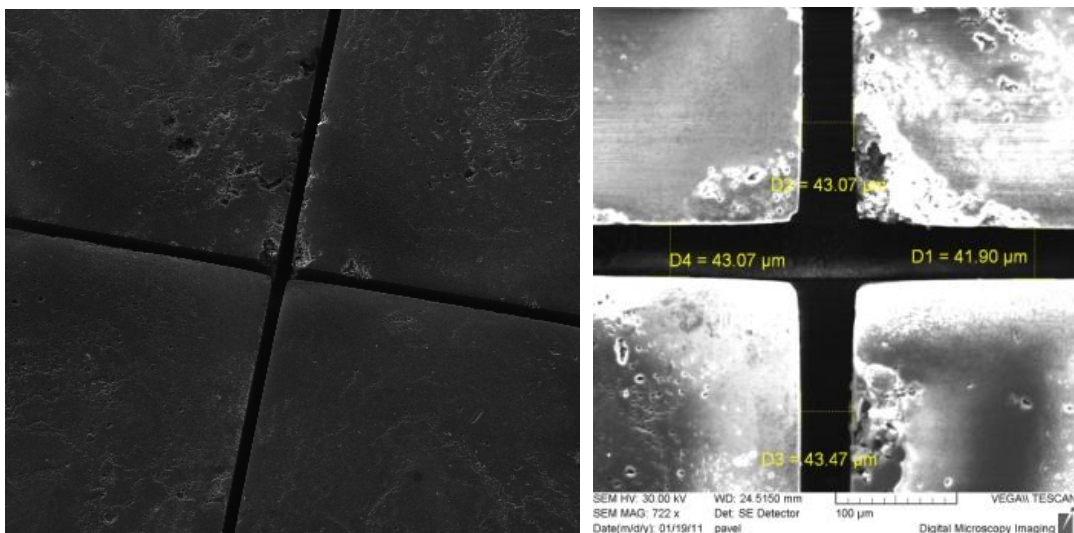


Obr. 52 Schéma zařízení s označenými oblastmi pro SEM analýzu

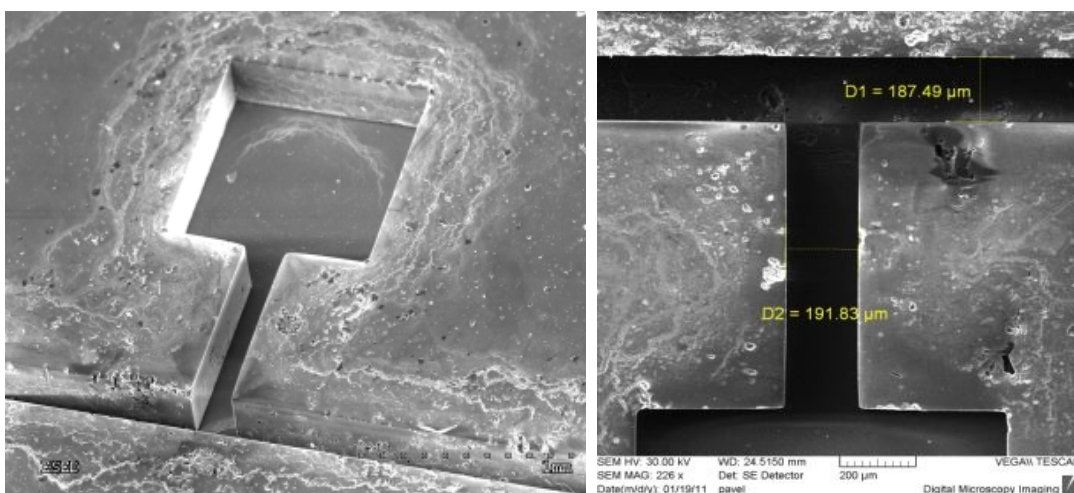
Provedená měření umožnila určit stupeň geometrické shody tvaru křemíkové matrice s vyrobeným diamantovým čipem. Na obrázcích 53 – 57 je ukázáno zvětšení jednotlivých detailů A – E a také výsledky získaných šířek kanálů, mikrozásobníků a zkušební struktury.



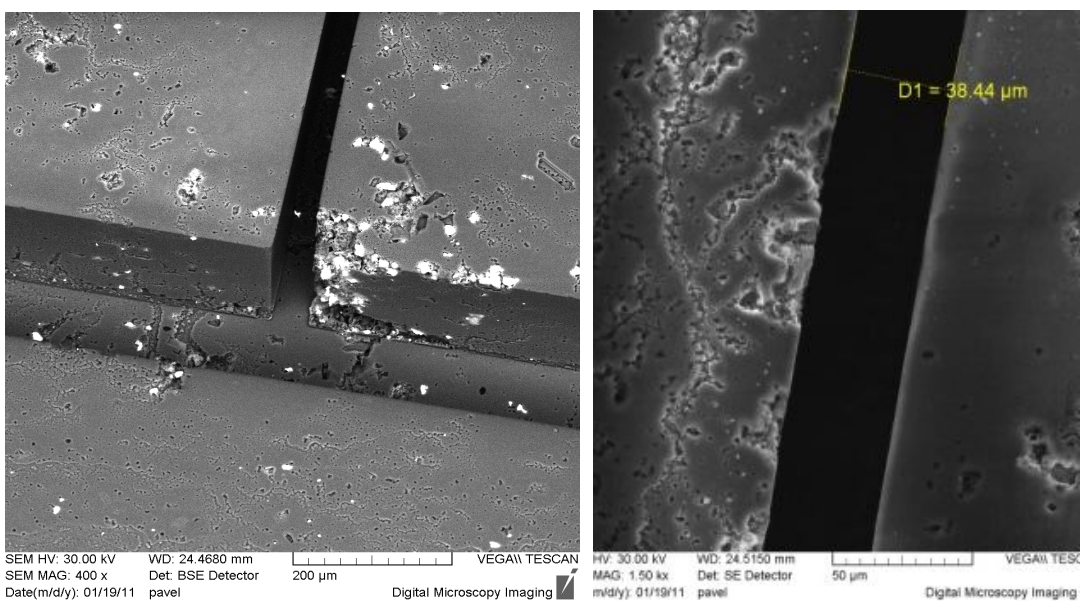
Obr. 53 SEM snímky detailu A



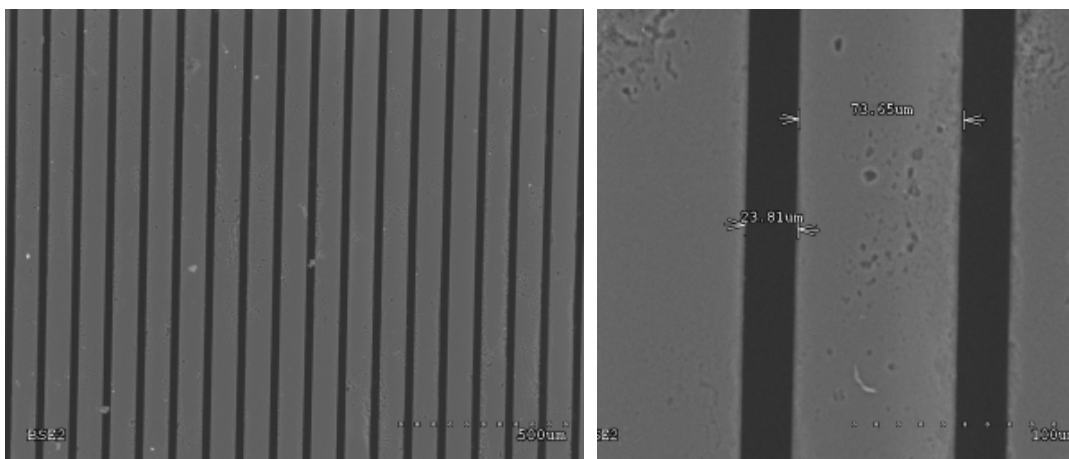
Obr. 54 SEM snímky detailu B



Obr. 55 SEM snímky detailu C

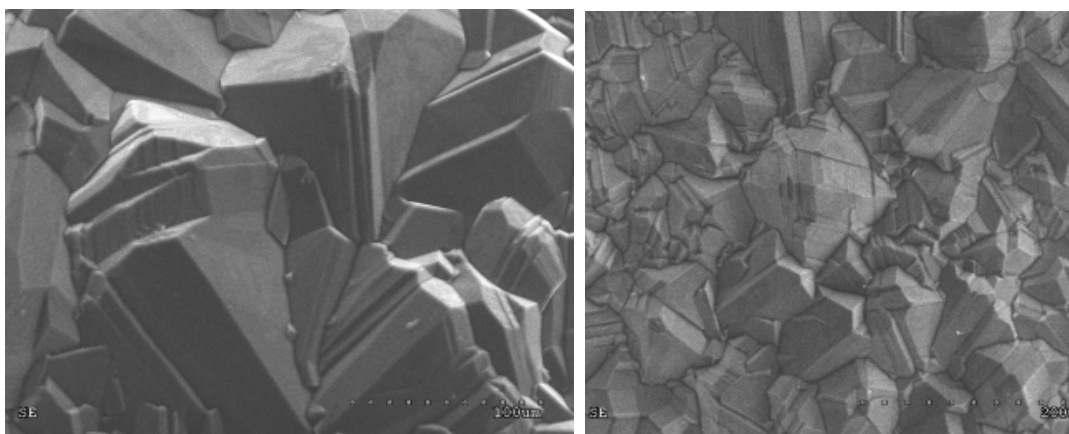


Obr. 56 SEM snímky detailu D



Obr. 57 SEM snímky zkušební struktury detailu E

Na obrázku 58 je uvedena polykrystalická strana vzrůstu diamantu za účelem předběžného určení velikosti zrna diamantu.



Obr. 58 SEM snímky polykrystalické strany vzrůstu diamantu

Provedená analýza umožnila identifikace vad a poškození povrchu mikrostruktury a také určení geometrických rozměrů diamantového zařízení. Vyrobená mikrostruktura obsahuje několik odštípnutí způsobených mechanickým poškozením. Získané rozměry jednotlivých součástí mikrostruktury jsou průměrem z 10 měření. Průměrná hodnota šířky hlavního kanálu byla $43 \pm 4 \mu\text{m}$, spojovacího kanálu $191 \pm 18 \mu\text{m}$, zkušební struktury $24 \pm 2 \mu\text{m}$ a $74 \pm 7 \mu\text{m}$. Průměrný rozměr mikrozásobníku byl $950 \pm 9 \mu\text{m} \times 950 \pm 9 \mu\text{m}$ a velikost zrna přibližně $100 \mu\text{m}$.

5.2.2 Konfokální mikroskopie

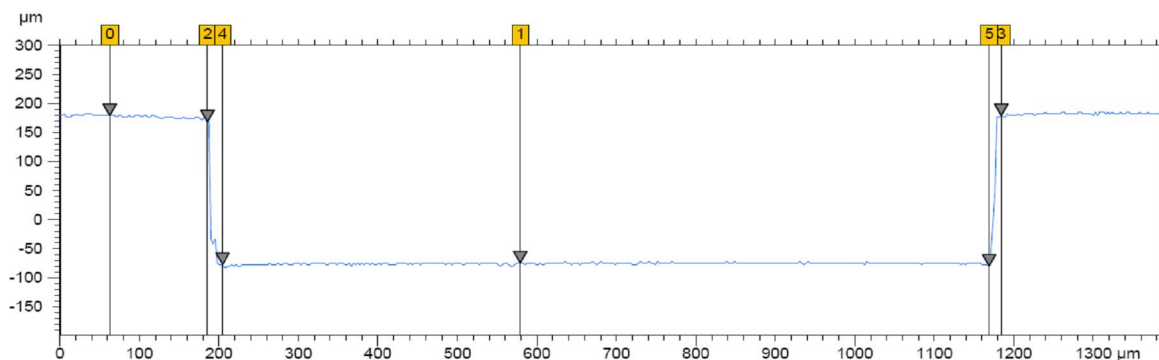
Pomocí CLSM byly určeny příčné průřezy mikrokanálů (bylo možné určit jejich hloubku). Dodatečně díky této technice bylo provedeno měření drsnosti dna mikrokanálu a

povrchu diamantového mikročipu. Prostřednictvím získaných parametrů drsnosti byl určen stupeň geometrické shody křemíkové matrice a diamantové mikrostruktury.

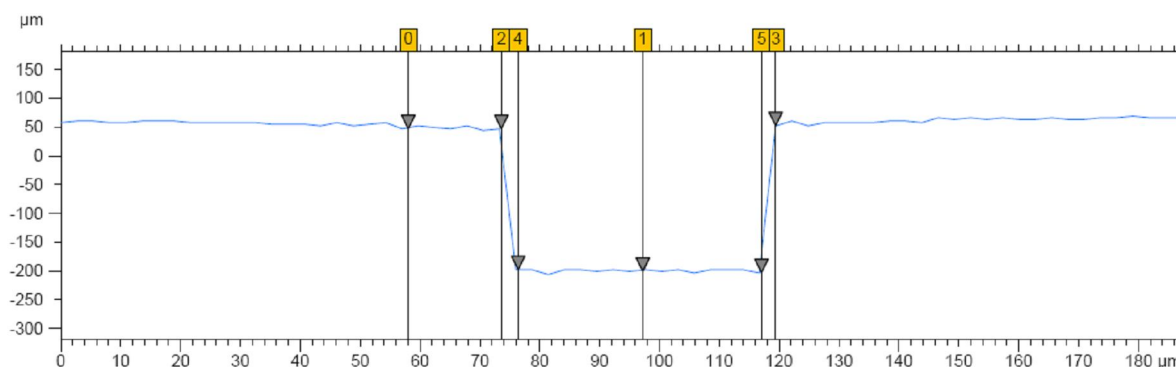
V tabulce 3 jsou shromážděny a prezentovány výsledky zkoumání hloubkových profilů a šířek mikrokanálů. Na obrázcích 59 – 61 jsou uvedeny příklady výsledků zkoumání příčných řezů kanálů a mikrozásobníků. Výsledky měření geometrie mikrokanálů jsou uvedeny v příloze číslo 3 této práce.

Tab. 3 Geometrické rozměry struktury získané pomocí CLSM metody

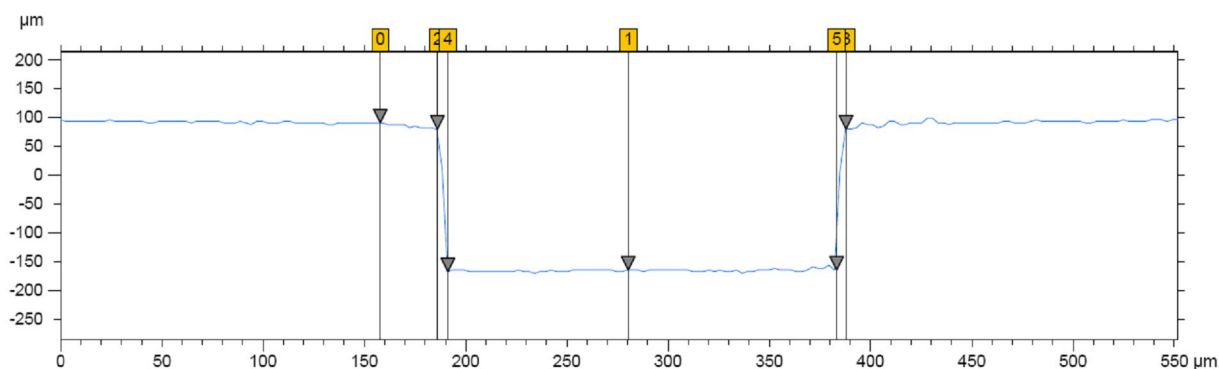
Měření	Zkoumaný prvek	Šířka [μm]		Hloubka [μm]
		Na dně kanálu	Na povrchu kanálu	
1	mikrozásobník	984	999	253
2		985	998	256
3		987	997	258
Průměr		985,3±1,5	998±1	255,6±2,5
1	Spojovací mikrokanál	192	202	256
2		193	205	248
3		191	201	253
Průměr		192±1	202,6±2	252,3±4
1	Hlavní mikrokanál	40,7	45,8	267
2		43,8	52,5	250
3		40,4	46,8	256
Průměr		41,6±1,8	48,3±3,6	257,6±8,6



Obr. 59 Příčný řez mikrozásobníkem



Obr. 60 Příčný řez hlavním mikrokanálem



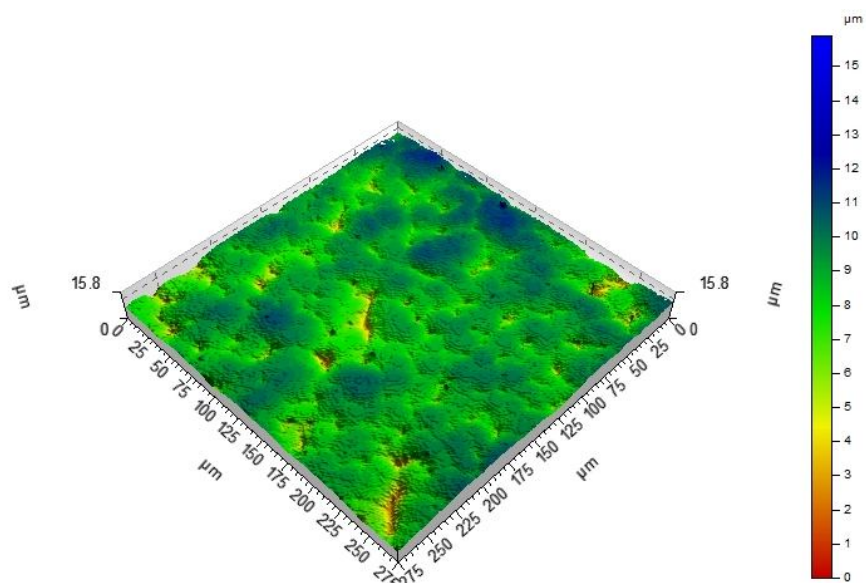
Obr. 61 Příčný řez spojovacím mikrokanálem

Provedené zkoumání prokázalo, že vyrobená struktura má mírnou nerovnoběžnost bočních stěn (lichoběžníkový tvar mikrokanálů), což je způsobeno replikou tvaru křemíkové matrice. Tabulka 4 uvádí výsledky změny geometrické struktury určené pomocí parametrů Ra, Rz a Rt. V průběhu zkoumání bylo provedeno kontrolní skenování povrchu (ve třech opakováních) o rozměrech 275 μm x 275 μm, na kterých byly vyznačeny dva čárové profily, z nichž byly následně získány parametry drsnosti. Průměrná hodnota drsnosti pro křemíkovou destičku, ze které byla vyrobena matrice, byla $Ra = 0,0005 \mu\text{m}$.

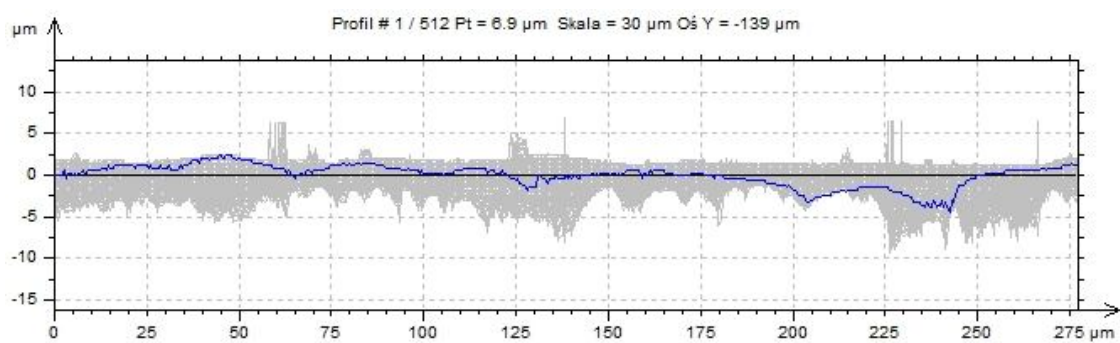
Tab. 4 Parametry drsnosti struktury

Číslo měření		Ra [μm]	Rz [μm]	Rt [μm]	
1	Povrch mikročipu	0,315	2,5	3,69	
		0,286	2,29	3,2	
2		0,321	2,5	3,77	
		0,354	2,88	4,38	
3		0,283	2,07	2,78	
		0,25	1,94	2,64	
Průměrná hodnota		0,3015±0,03	2,363±0,33	3,41±0,06	
1	Dno mikrostruktury	0,00788	0,508	0,991	
		0,0105	0,587	1,06	
		2	0,0106	0,666	1,25
			0,0238	0,948	1,55
		3	0,01	0,507	1,01
			0,0141	0,547	0,984
Průměrná hodnota		0,0128±0,005	0,627±0,16	1,14±0,22	

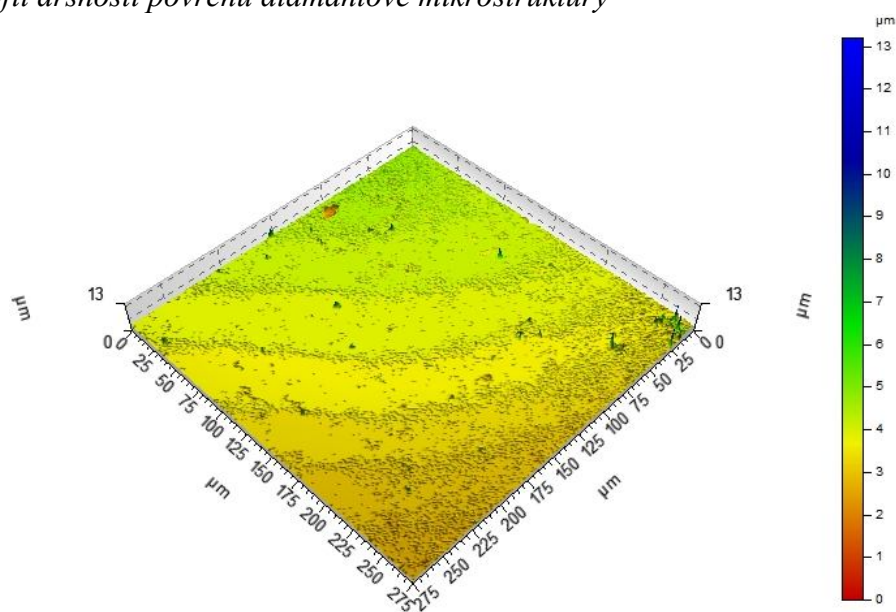
Na obrázcích 62 – 65 jsou uvedeny příklady výsledků topografie a také získané profily drsnosti zkoumaného povrchu a dna diamantové mikrostruktury. Ostatní výsledky se nacházejí v příloze číslo 3 této práce.



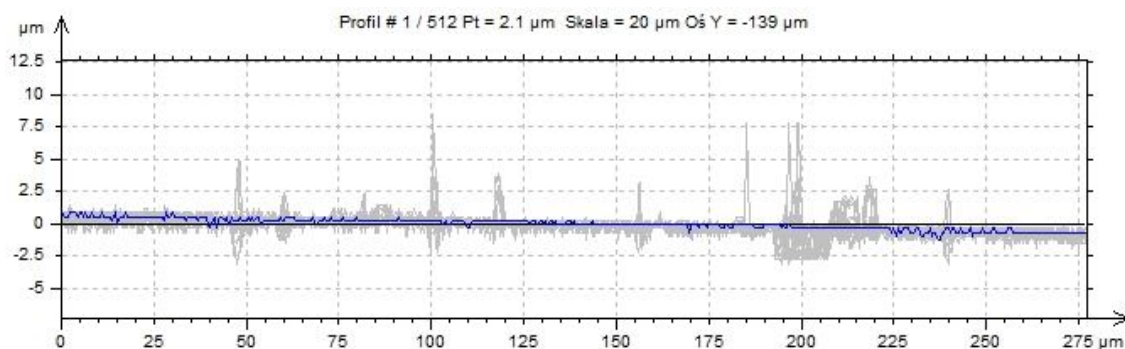
Obr. 62 Topografie povrchu diamantové mikrostruktury



Obr. 63 Profil drsnosti povrchu diamantové mikrostruktury



Obr. 64 Topografie povrchu dna diamantové mikrostruktury

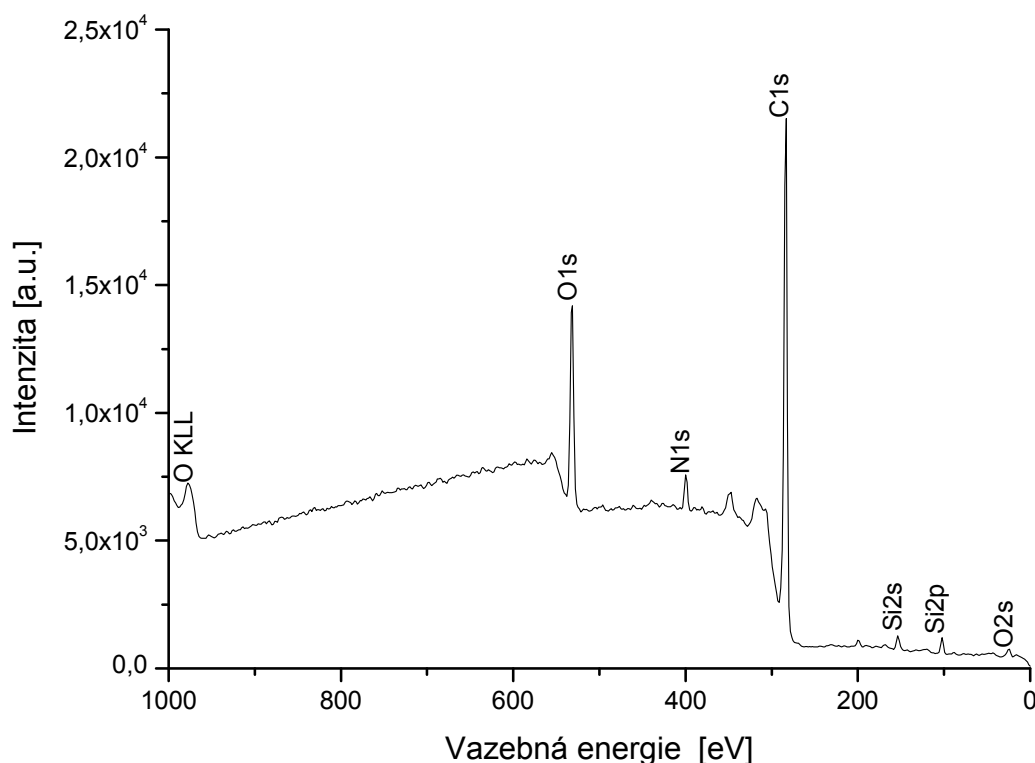


Obr. 65 Profil drsnosti dna diamantové mikrostruktury

5.3 Výsledky fyzikálně – chemických a mechanických zkoumání

5.3.1 Fotoelektronová spektroskopie XPS

Zkoumání pomocí metody XPS umožnilo stanovení chemického složení povrchu vzorku. Na obrázku 66 jsou uvedeny jednotlivé prvky nacházející se na zkoumaném povrchu. Zbytkové množství křemíku pozorované ve spektru je důsledkem nepřesného leptání křemíkové matrice, na níž byla vyrobená diamantová mikrostruktura. Pro ostatní prvky (C, O, N) byla provedena analýza ve vysokém rozlišení.



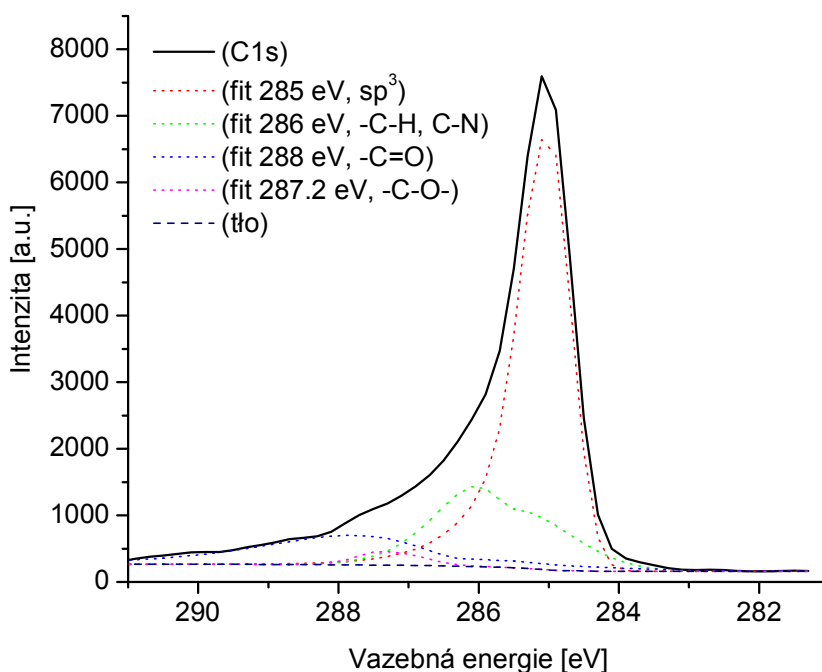
Obr. 66 XPS spektrum diamantového vzorku v rozsahu od 1000 do 0 eV

V tabulce 5 jsou uvedeny atomové koncentrace jednotlivých fází zjištěných během analýzy.

Tab. 5 Kvantitativní analýza chemického složení

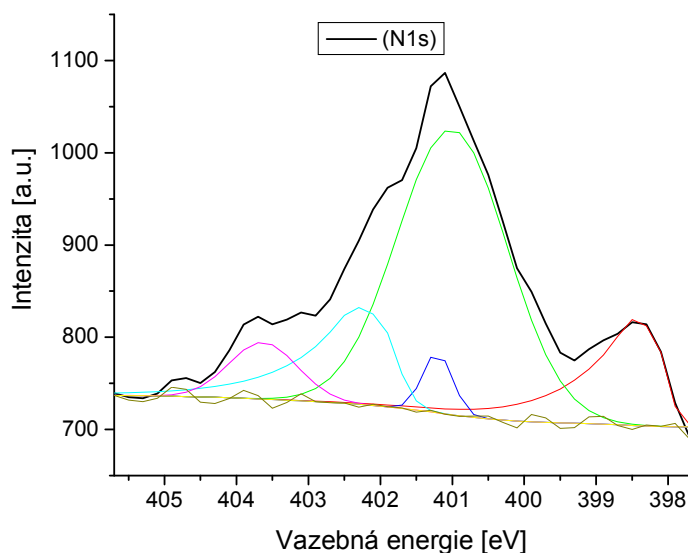
Element	At. [%]
C1s	78,6
O1s	15,4
N1s	3,4
Si2p	1,7

Na obrázcích 67 – 69 jsou uvedena spektra XPS ve vysokém rozlišení pro uhlík, kyslík a dusík. Spektra jednotlivých píků byly fitovány s využitím originálního softwaru zařízení. Získaná spektra byla využita k určení druhů chemických vazeb vyskytujících se na povrchu zkoumaného vzorku.

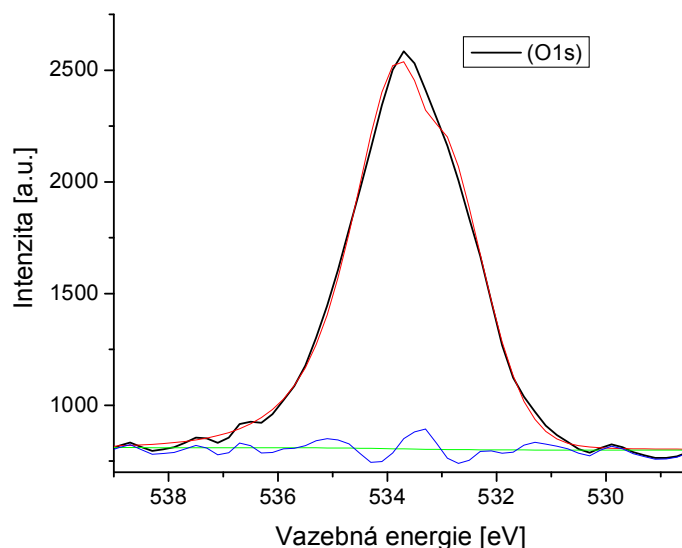


Obr. 67 XPS spektrum ve vysokém rozlišení pro uhlík

Analýza vysoce rozlišeného spektra XPS píku C1s byla provedena po odstranění pozadí rozložením na jednotlivé složky odpovídající vazbou uhlíku s jinými atomy. Zkoumání prokázalo přítomnost čtyř píků, které na základě literární rešerše, byly přiděleny jednotlivým vazbám. Hlavní pík na úrovni 285 eV odpovídá vazbě C–C sp^3 [128,129]. Další píky odpovídají v pořadí pro 286 eV vazbě –C–H, C–N a také pro 288 eV vazbě –C=O. Poslední pík 287,2 eV odpovídá vazbě –C–O– [130,131].



Obr. 68 XPS spektrum ve vysokém rozlišení pro dusík

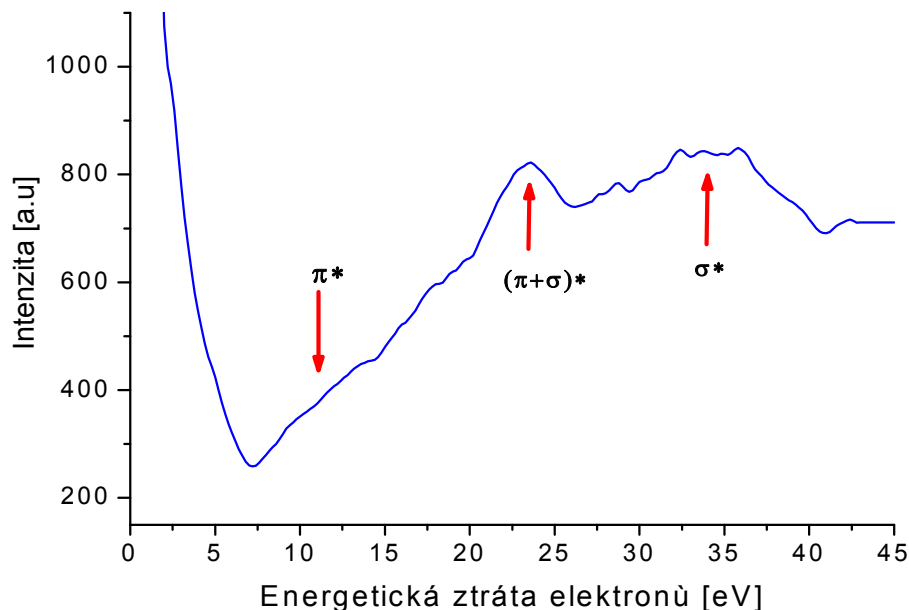


Obr. 69 XPS spektrum ve vysokém rozlišení pro kyslík

Spektrum ve vysokém rozlišení pro N1s ukázalo nízkou intenzitu píku a jeho velkou šířku. Může to znamenat výskyt vazeb C–N a zároveň vazeb dvojitých a trojitých. Analýza O1s také prokázala dva stavy s rozdíly kolem 1 eV pro C–O i C=O. Fitování píku pomocí jedné křivky nebylo dostačující. Z provedené analýzy O1s a N1s lze konstatovat, že s největší pravděpodobností jsou atomy dusíku a také kyslíku vázány s nediamantovými druhy uhlíku vyskytujícími se podél povrchu hranic zrn.

Provedená spektroskopie charakteristických energetických ztrát elektronů EELS (*ang. Electron Energy Loss Spectroscopy*) píku C1s ukázala spektrum velmi podobné jednoduchému krystalu. Široká rezonance π - π^* o nízké intenzitě v rozmezí od 9 do 13 eV

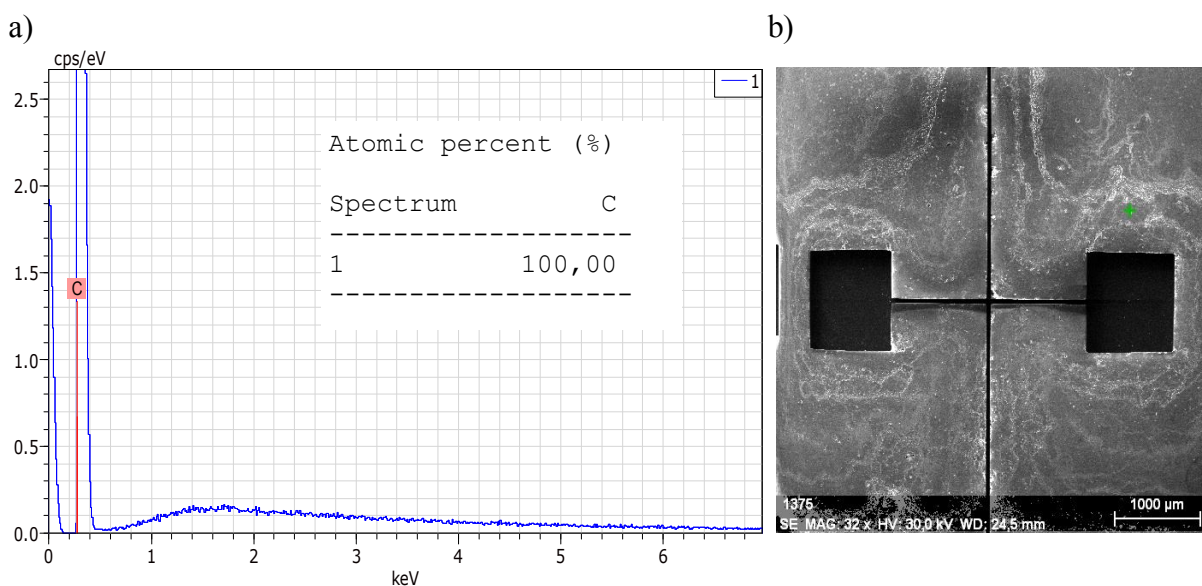
ukazuje přítomnost vazeb sp^2 amorfního uhlíku (pouze na povrchu) [132]. Na obrázku 70 je zobrazeno spektrum získané během zkoumání.



Obr. 70 Spektroskopie charakteristických energetických ztrát elektronů

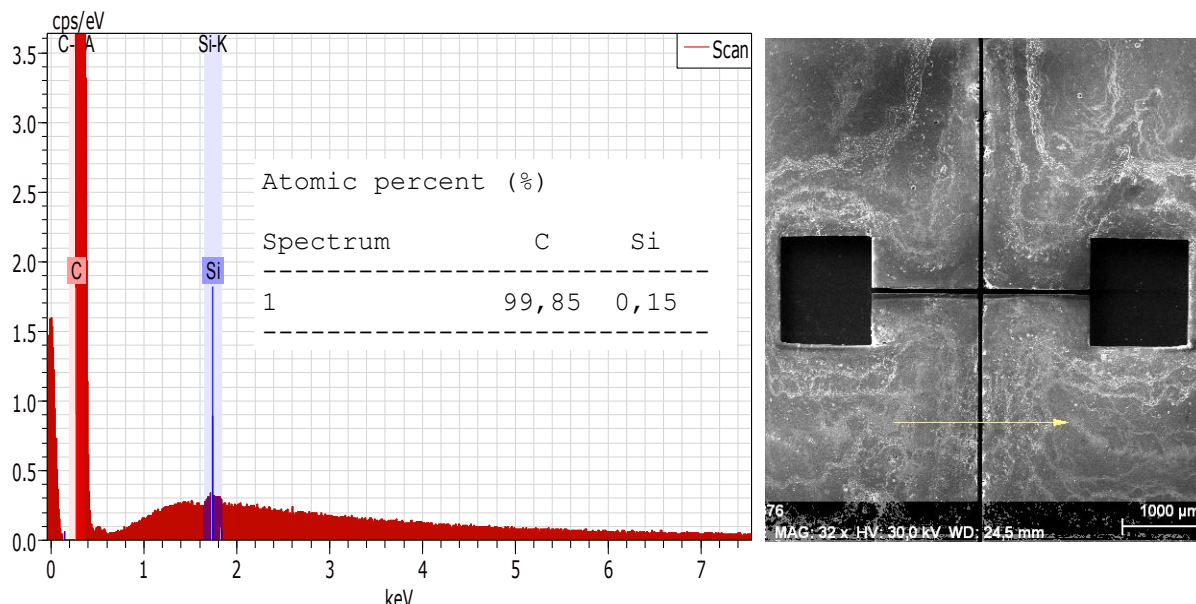
5.3.2 Rentgenová mikroanalýza EDX

Provedením zkoumání EDX bylo určeno chemické složení povrchu zkoumaných vzorků. Obrázek 71 ukazuje výsledek zkoumání chemického složení v bodě pomocí rentgenové mikroanalýzy EDX. Analýza ve vzorku prokázala pouze samotný uhlík, což potvrdilo dobrou kvalitu vyrobené diamantové mikrostruktury.

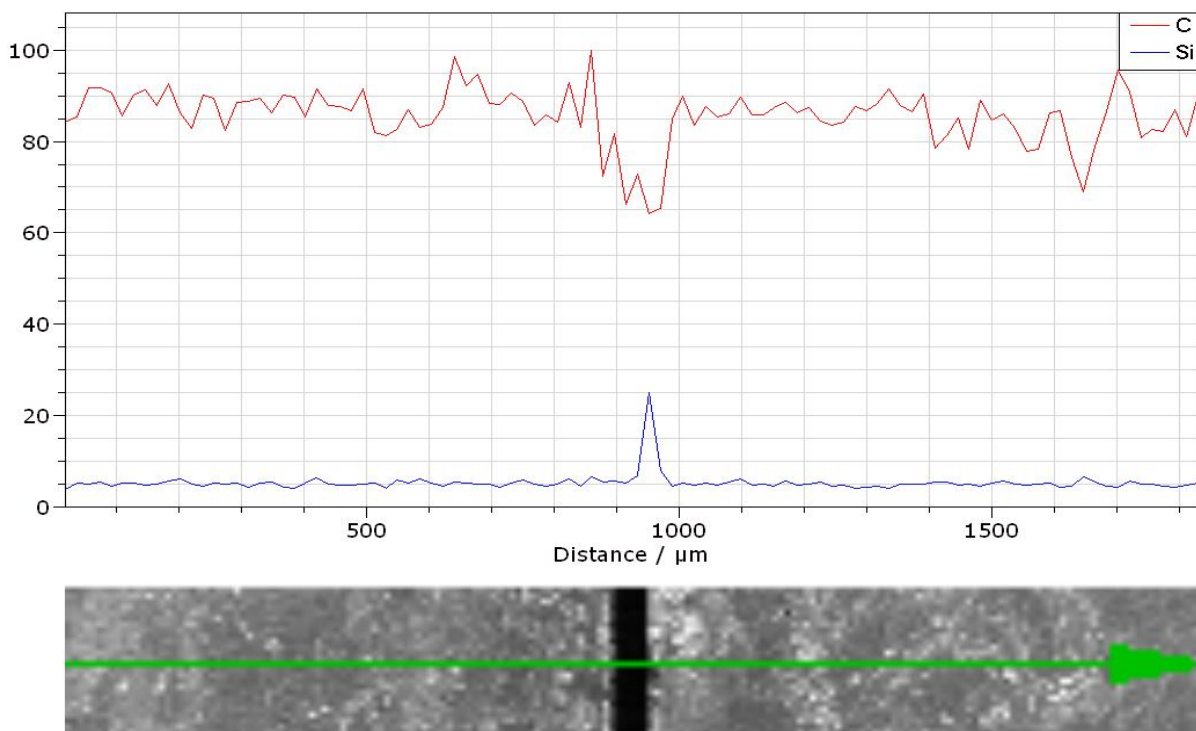


Obr. 71 Bodová mikroanalýza EDX: a) spektrum, b) označené místo měření

Dalším zkoumáním využívajícím techniku EDX byla analýza podle linie. Měření bylo provedeno podél linie kolmé k mikrokanálu. Studie prokázala velmi malé množství křemíku nacházejícího se na okraji mikrokanálu. Přítomnost tohoto prvku je vysvětlována nepřesností leptání křemíkové matrice z diamantové mikrostruktury. Na obrázcích 72, 73 jsou uvedeny výsledky liniové analýzy chemického složení na linii o délce 1850 μm .



Obr. 72 Liniová mikroanalýza EDX získaná napříč mikrokanálem



Obr. 73 Výsledek zkoumání EDX s označenými změnami chemického složení

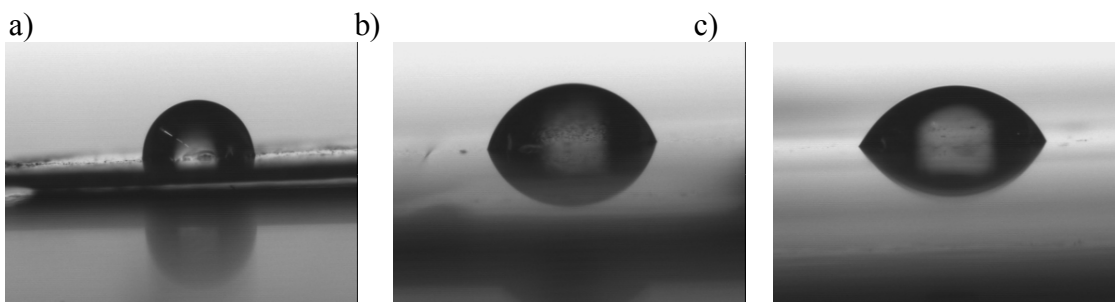
5.3.3 Smáčivost povrchu

V tabulce 6 jsou shrnuty hodnoty úhlu smáčení zkoumaného diamantového vzorku pro deionizovanou vodu a diiodometan. Vzorky byly zkoumány ve třech etapách: po výrobě, po 90-ti dnech a po 180-ti dnech. Z tabulky 6 je patrné, že vyrobený diamantový vzorek byl silně hydrofobní, přičemž postupem času jeho hydrofobní charakter klesal. Byly tedy pozorovány změny úhlů smáčení v čase. Testované povrchy časem vykazovaly vyšší hydrofilitu.

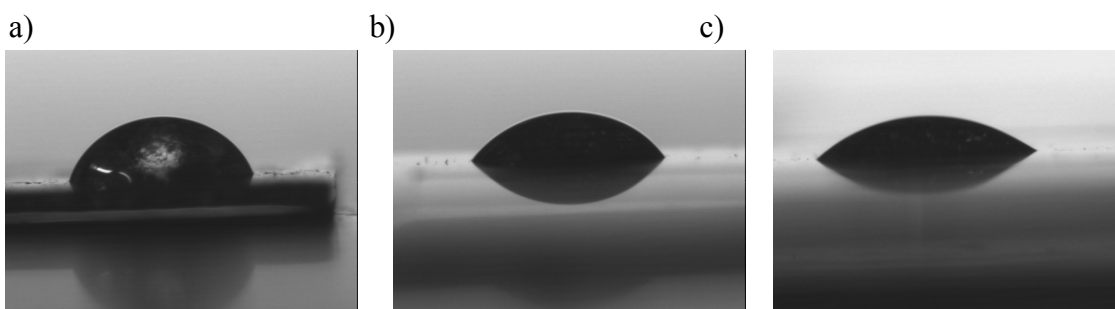
Tab. 6 Hodnoty kontaktního úhlu vzorků měřené v pravidelných intervalech

Č.	Zkoumaný vzorek	Hodnota kontaktního úhlu pro vodu	Hodnota kontaktního úhlu pro diiodometan
		Θ_{sr} [deg]	Θ_{sr} [deg]
1.	Po výrobě	$90,7 \pm 2,24$	$71,4 \pm 3,54$
2.	Po 90 dnech	$73,6 \pm 2,83$	$59,4 \pm 2,89$
3.	Po 180 dnech	$63,7 \pm 3,01$	$41,3 \pm 1,2$

Na obrázcích 74 a také 75 jsou uvedeny změny kontaktního úhlu v čase pro diamantový vzorek smáčený v pořadí vodou a diiodometanem.



Obr. 74 Profil kapky vody na zkoumaném povrchu: a) po výrobě, b) po 90 dnech, c) po 180 dnech



Obr. 75 Profil kapky diiodometanu na zkoumaném diamantovém povrchu: a) po výrobě, b) po 90 dnech, c) po 180 dnech

5.3.4 Volná povrchová energie

Pomocí rovnice (12), při předpokládané známé hodnotě disperzní a polární složky dvou různých tekutin jejich odpovídajících hodnot úhlu smáčení, získáváme rovnice (23) a (24) umožňující výpočet disperzní a polární složky zkoumaného materiálu.

$$(\gamma_s^d)^{0,5} = \frac{\gamma_d(\cos\Theta_d + 1) - \sqrt{\frac{\gamma_d^p}{\gamma_w^p}} \times \gamma_w(\cos\Theta_w + 1)}{2 \left[\sqrt{\gamma_d^d} - \sqrt{\gamma_d^p \frac{\gamma_w^d}{\gamma_w^p}} \right]} \quad (23)$$

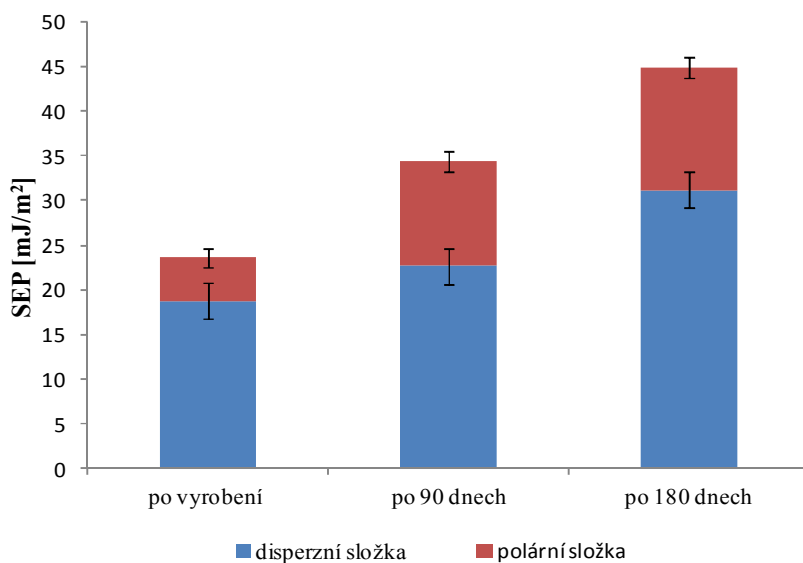
$$(\gamma_s^p)^{0,5} = \frac{\gamma_w(\cos\Theta_w + 1) - 2\sqrt{\gamma_s^d \times \gamma_w^D}}{2\sqrt{\gamma_w^p}} \quad (24)$$

kde: γ_d – SEP pro diiodometan, γ_d^p, γ_d^d – disperzní a polární složka diiodometanu, Θ_d – úhel smáčení diiodometanem γ_w – SEP pro vodu, γ_w^d, γ_w^p – disperzní a polární složka vody, Θ_w – úhel smáčení vodou

Dosazením získaných hodnot jednotlivých složek do vztahu (25) dostáváme hodnotu volné povrchové energie materiálu.

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \frac{mJ}{m^2} \quad (25)$$

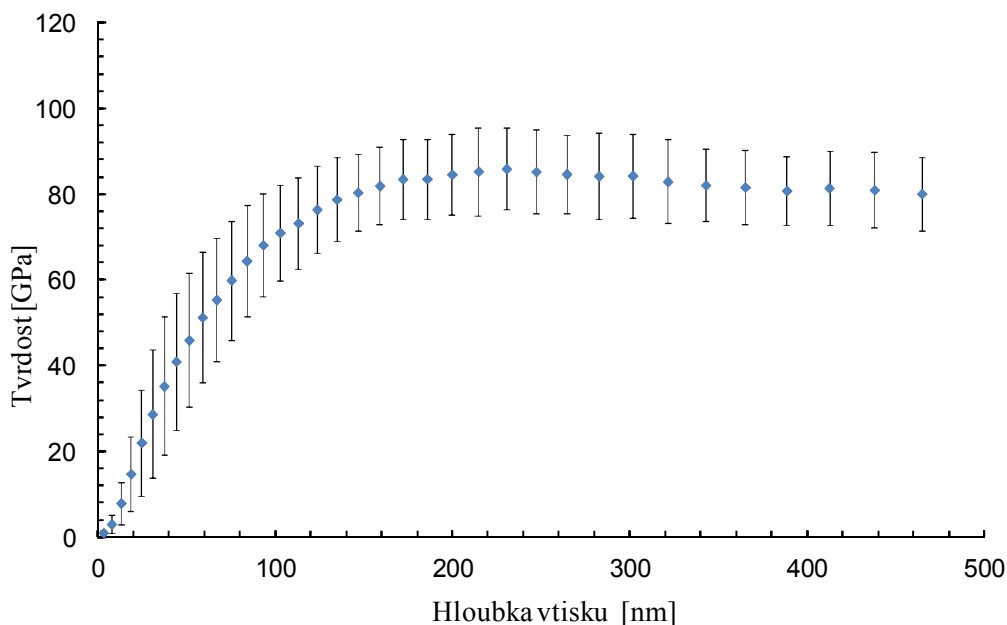
Ze získaných výsledků kontaktního úhlu s vodou a diiodometanem (tabulka 6), a také konstantními hodnotami uvedenými v tabulce 2, byly získány hodnoty SEP uvedené na obrázku 76.



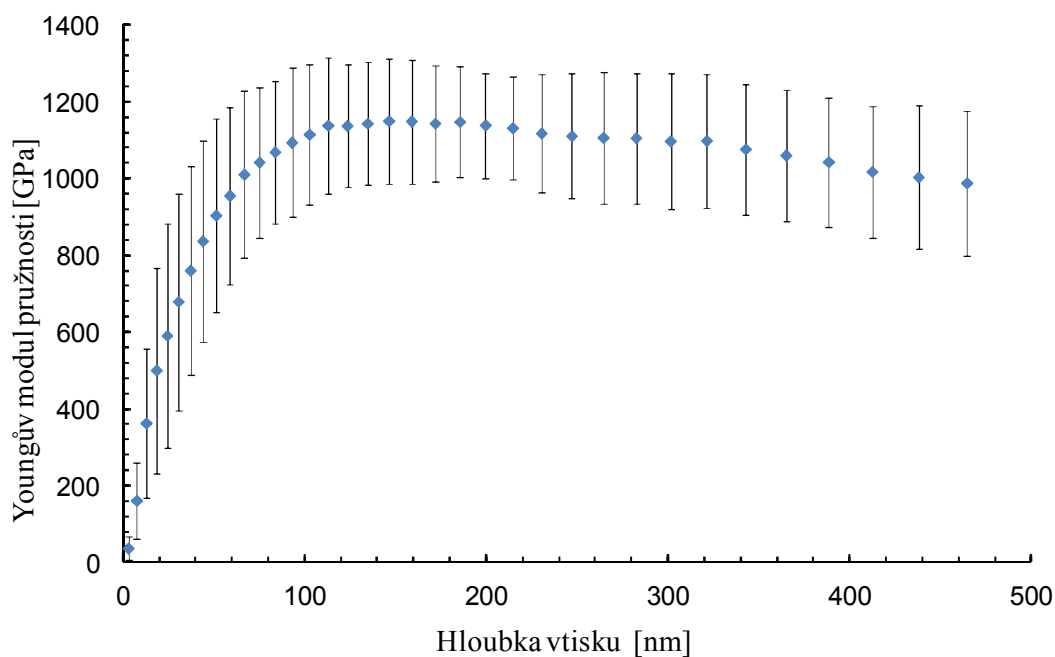
Obr. 76 Výsledky výpočtu volné povrchové energie zkoumaného vzorku

5.3.5 Tvrdost a Youngův modul pružnosti

V rámci zkoumání mechanických vlastností byla stanovena tvrdost a Youngův modul zkoušeného diamantového vzorku. Na obrázcích 77 a také 78 jsou uvedeny v pořadí distribuce tvrdosti a také Youngův modul pružnosti, naměřené v rozsahu do hloubky 480 nm od povrchu vzorku. Průměrná hodnota tvrdosti byla $85,1 \pm 10,2$ GPa a průměrná hodnota Youngova modulu byla $1114,5 \pm 183,8$ GPa.



Obr. 77 Graf zobrazující změnu tvrdosti ve funkci proniknutí indentoru do vzorku

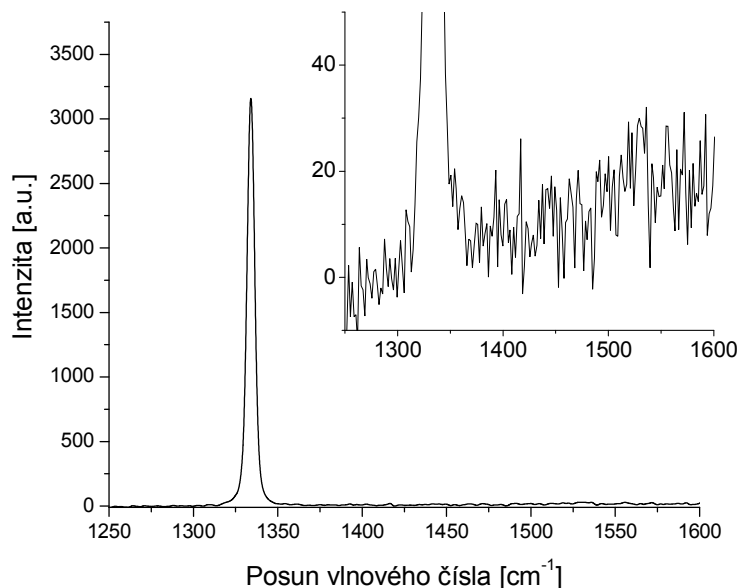


Obr. 78 Graf zobrazující změnu Youngova modulu ve funkci proniknutí indentoru do vzorku

5.4 Výsledky zkoumání fázového složení

5.4.1 Ramanova spektroskopie

Na obrázku 79 je uveden příklad Ramanova spektra naměřeného uvnitř mikrokanálu diamantové destičky.



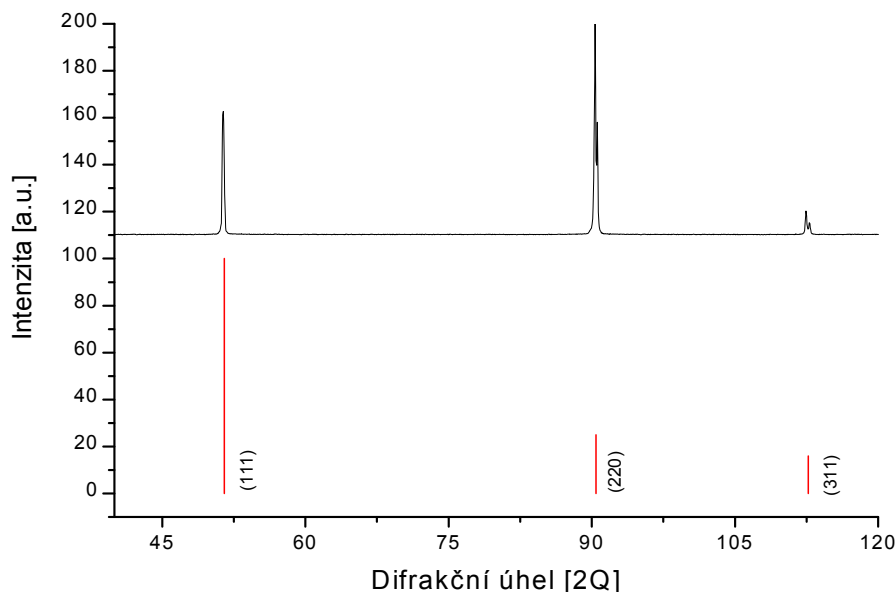
Obr. 79 Příklad Ramanova spektra získaného v mikrokanálu; zvětšení ukazuje nepřítomnost jiných charakteristických píků od různých fází uhlíku

Na zaznamenaných spektrech byl pozorován pouze jeden pík na hodnotě 1332 cm^{-1} (primární pík) charakteristický pro krystalický diamant. Nepřítomnost dalších Ramanových píků v rozmezí $1300 - 1600\text{ cm}^{-1}$ potvrzuje vysokou čistotu vyrobené polykrystalické diamantové struktury. Ramanovo měření provedené v různých místech povrchu potvrdilo homogenitu vytvořené silné vrstvy. Vzniklé rozdíly v primárních Ramanových píkách jsou menší než $0,7\text{ cm}^{-1}$. Parametr šířky v polovině maxima FWHM se pohyboval v rozmezí $3,5 - 3,9\text{ cm}^{-1}$ a potvrdil vysokou krystalinitu struktury. Výsledky jednotlivých spekter pro konkrétní body jsou uvedeny v příloze 4 této práce.

5.4.2 Rentgenová difrakce XRD

Fázová analýza, provedená pomocí rentgenové difrakce s využitím kobaltové lampy, umožnila určení dominující roviny (220), která narůstá paralelně do povrchu. Získané píky jsou úzké a ostré, což naznačuje vysoký stupeň krystalinity a uspořádání struktury. Na obrázku 80 je uveden rentgenovský difraktogram zkoumaného diamantového vzorku. Na tomto difraktogramu byly identifikovány následující signály jednotlivých rovin: (111) při úhlu $2\Theta=51,51^\circ$, (220) při úhlu $2\Theta=90,44^\circ$, a také (311) při úhlu $2\Theta=112,68^\circ$.

Provedenou analýzou byla zjištěna existence významného směru krystalografické orientace zkoumaného materiálu (222), který označuje výskyt textury analyzovaného vzorku.



Obr. 80 Difraktogram diamantového vzorku s označenými rovinami a také jejich intenzitou ve srovnání s krystalografickou databází ICDD

5.5 Výsledky zkoumání tepelných vlastností

Pro určení tepelné difuzivity α byl použit jednoduchý adiabatický model [119]. V tomto modelu je vyžadováno, aby délka pulsu laseru byla srovnatelná s polovičním časem přenosu tepla.

Polovina času náběhu $t_{0.5}$ signálu detektoru je určena vztahem:

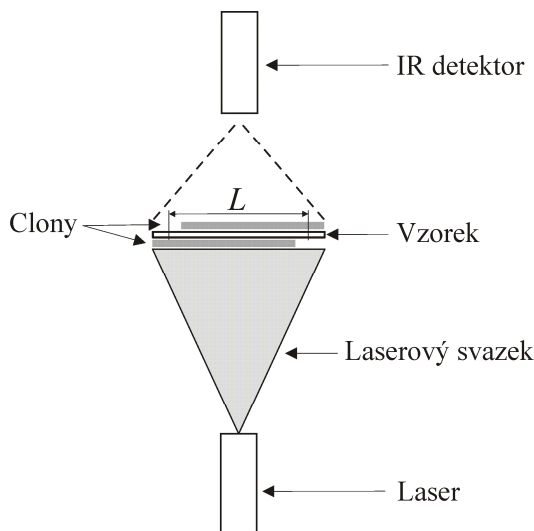
$$t_{0.5} = \frac{0.1387 \cdot L^2}{\alpha} \quad (26)$$

kde: L – je tloušťkou vzorku (dráha přenosu tepla)

α – tepelná difuzivita

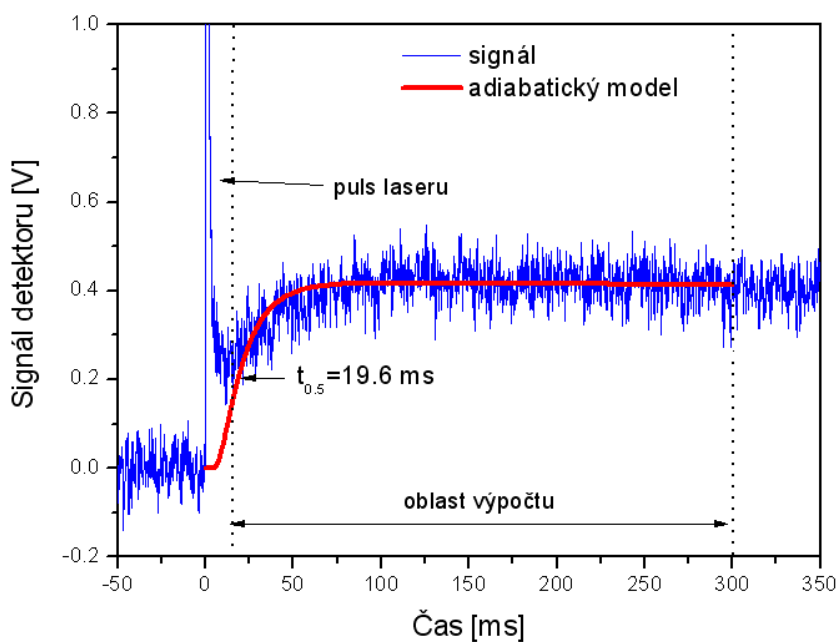
Měření tenkých vzorků z materiálů, které jsou charakterizovány vysokou tepelnou difuzivitou α , je náročné z hlediska velmi krátkého času přenosu tepla. Vypočtený čas $t_{0.5}$ poloviny nárůstu signálu z detektoru zkoumaného vzorku o tloušťce přibližně 0,35 mm a očekávané tepelné difuzivity $\alpha = 700 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ je kolem 20 μs . Tato doba je mnohem kratší, než minimální délka laserového pulsu zařízení, která je 330 μs . Z toho důvodu, měření tepelné vodivosti diamantového vzorku pomocí této metody ve směru kolmém k povrchu, je prakticky nemožné. V důsledku toho byla určena tepelná vodivost vzorku ve směru rovnoběžném s jeho povrchem. Pro tento účel byla použita upravená metoda měření, která předpokládala použití

speciálních clon, kterými byla absorpce tepla zaručená podél vzorku. Schéma průběhu modifikované metody je znázorněno na obrázku 81. Vzorek byl potažen tenkou vrstvou grafitu s cílem zvýšení absorpce laserových paprsků. K měření tepelné difuzivity byla přijata průměrná dráha přenosu tepla jako vzdálenost mezi nezacloněnými plochami na vzorku ($L = 9,5 \text{ mm}$).



Obr. 81 Schéma průběhu měření modifikované metody k měření tepelné difuzivity ve směru rovnoběžném s jeho povrchem

Obrázek 82 ukazuje příklad výstupního signálu měřeného infračerveným detektorem In – Sb a také teoretickou křivku vypočtenou pro adiabatický model. Laserový pík nebyl brán v úvahu při výpočtech.

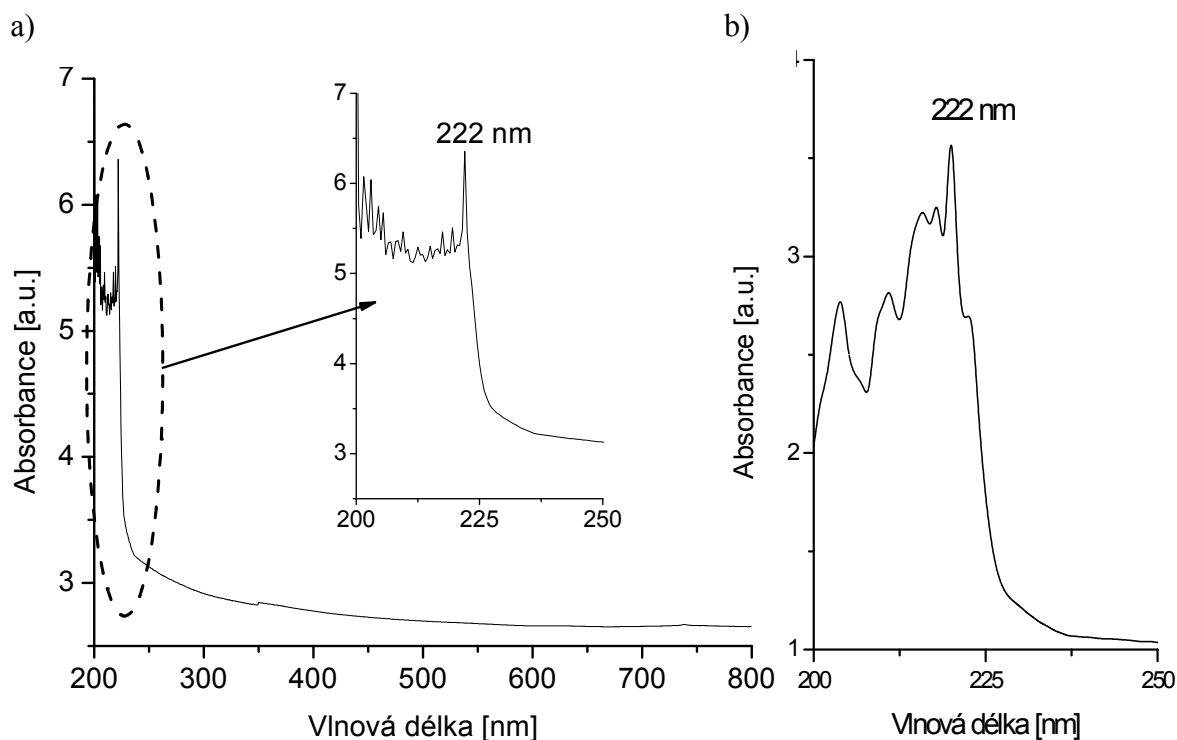


Obr. 82 Výstupní signál měřený In-Sb infračerveným detektorem a proložení křivkou pro adiabatický model

Hodnota tepelné difuzivity α počítána z pěti měření se nachází v rozmezí od 570 do 700 mm² · s⁻¹. Z naměřených hodnot tepelné difuzivity, jakož i materiálových vlastností diamantu získaných z literatury $\rho = 3,51 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $c_p = 1,481 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ [133], a s použitím rovnice 26 byly získány hodnoty tepelné vodivosti λ v rozmezí od 1040 do 1280 Wm⁻¹K⁻¹.

5.6 Výsledky zkoumání optických vlastností

Obrázek 83a ukazuje spektrum UV-Vis absorpce diamantového mikročipu měřeného ve standardní konfiguraci dvojitého svazku bez referenčního vzorku. Vysoká absorbance je patrná v celém rozsahu vlnových délek. Získaná hodnota absorpčního pásu 222 nm umožnila výpočet energie zakázaného pásu, která činila 5,58 eV pro zkoumaný materiál. Nepatrný rozdíl od tabulkových hodnot pravděpodobně vyplýval z různých metod odhadu energetických mezer. S cílem snížení podílu rozptylu v absorpčních spektrech byla použita integrující koule. Vzorek byl umístěn tak, aby rozptýlená vlna byla zachycená v integrující sféře. Získané výsledky jsou uvedeny na obrázku 83 b. Jak se dalo očekávat, rozptyl silně oslabuje získané maximum při 222 nm. Obdržená odhadovaná energetická mezera také potvrdila nepřítomnost nečistot ve vyrobeném mikročipu.



Obr. 83 Absorpční spektra diamantového mikročipu v oblasti UV-Vis: a) získané ve standardní transmisní konfiguraci, b) při použití integrační koule

5.7 Výsledky měření rozložení teploty provedené termovizní kamerou

Celkovým cílem tohoto zkoumání bylo charakterizovat soustavu z hlediska rozložení teplot analyzovaných povrchů (povrch Peltierova článku i kryt z křemenného skla) a určit vliv chlazení na rozložení teplot v průběhu elektroforetického procesu provedeného v diamantových mikrokanálech mikročipu.

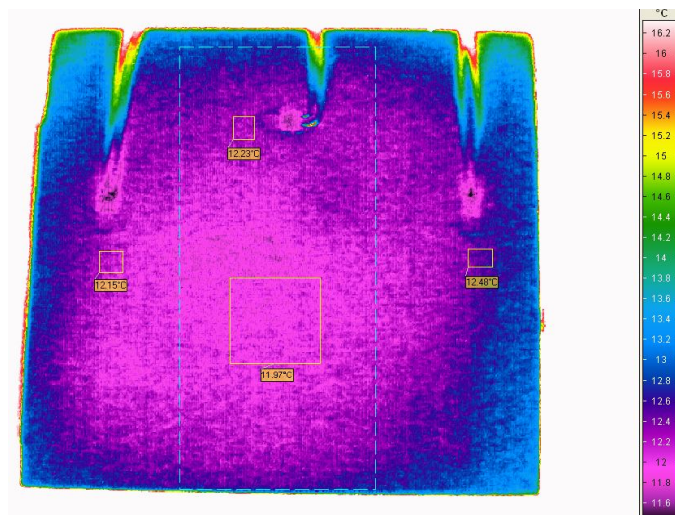
Prvním krokem zkoumání bylo určení hodnoty koeficientu emisivity zkoumaných prvků. Tato charakteristika byla realizovaná pomocí metody s referenčním tělem. Těly, kterými byla určena emisivita povrchu, byl Peltierův článek (keramika 96% Al_2O_3 společnosti Hoechst) a také sklo z čistého taveného křemene GE214 společnosti Continental Trade uzavírajícího mikrostrukturu.

Stanovené hodnoty koeficientu emisivity pro zkoumané materiály jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7 Hodnoty koeficientu emisivity zkoumaných materiálů

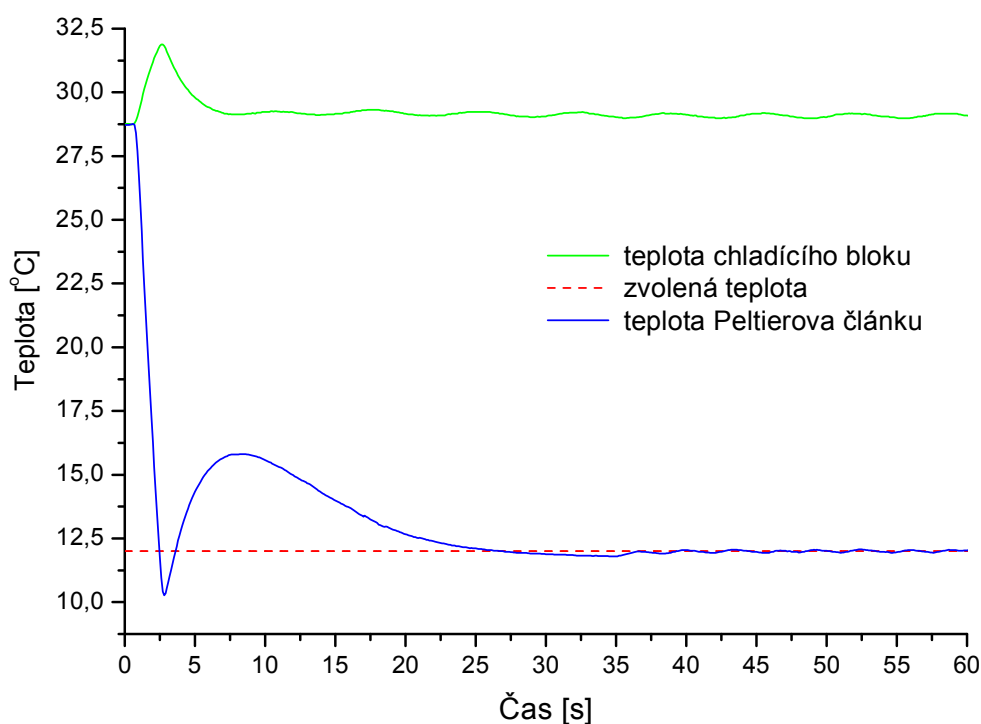
Druh materiálu	Emisivita
Keramika Al_2O_3	0,9
Křemenné sklo	0,95

V další fázi výzkumu byl zjištěn stupeň homogenity chlazení Peltierova článku. Pro tento účel byl sestaven chladicí systém charakterizovaný v rozsahu -5 až 25°C s intervalem 1°C za použití termovizní kamery VarioCam. Získané termogramy byly naměřeny po dosažení požadované teploty. Studie potvrdila nepatrné teplotní gradienty na povrchu termočlánku, které se nacházely převážně na okrajích článku. Tyto rozdíly neměly žádný vliv na další výzkum, protože Peltierův článek byl zvolen tak, aby se místa s rozdílnými teplotami aktivně neúčastnila průběhu chlazení mikročipu (geometrické rozměry termočlánku 50×50 mm, mikročip 31×31 mm). Na obrázku 84 je uveden příklad termogramu ukazující rozložení teploty na povrchu termočlánku při zvolené teplotě 12°C . Na termogramu jsou znázorněny čtyři oblasti měření teploty, jejichž hodnota se pohybuje v rozmezí od $11,97$ do $12,23^\circ\text{C}$ v závislosti na zkoušeném místě. Oblast označená přerušovanou čarou byla použita pro výběr dolního a horního rozsahu palety barev. Plná termografická charakteristika Peltierova článku je umístěna v příloze 5 této práce.



Obr. 84 Příklad rozložení teploty na povrchu Peltierova článku (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)

Regulátor PID ovládající zařízení, v závislosti na zvolené teplotě, vyžadoval přibližně 25 sekund pro přesné a stabilní nastavení požadovaného parametru. Na obrázku 85 je uveden příklad výsledku zkoumání chladicí teploty 12°C, na kterém můžeme vidět modře znázorněnou teplotní křivku zaznamenanou rezistenčním snímačem Pt – 100. V první fázi práce je vidět krátkodobé překročení zvolené teploty (přechodový stav) vyplývající z charakteristiky regulátoru a pak následuje přesná stabilizace teploty. Zelená čára je teplotou chladicího bloku, která v první etapě narůstá o několik stupňů v důsledku přenosu tepla z povrchu článku. V další etapě dochází k normalizaci teploty.



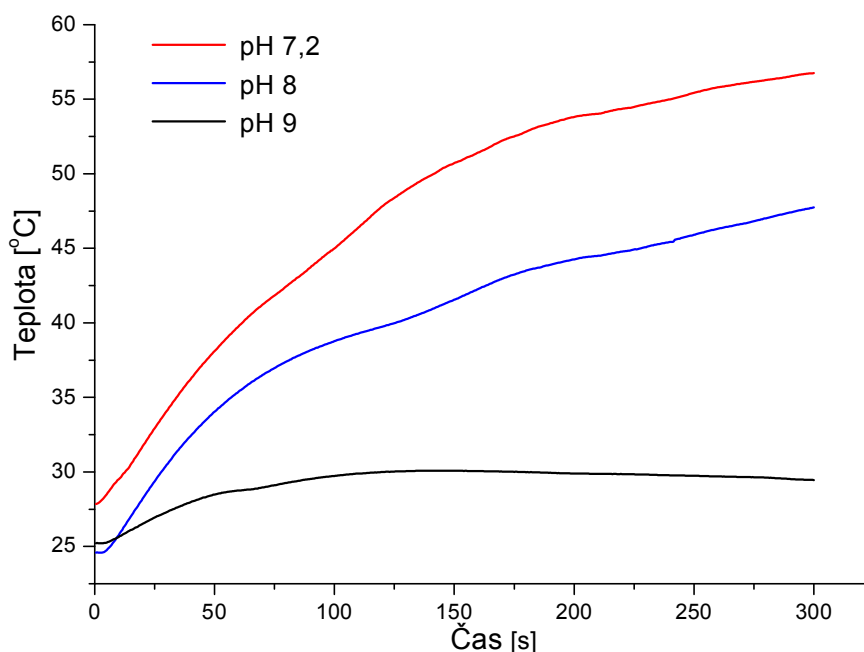
Obr. 85 Průběh chlazení v závislosti na čase pro zvolenou teplotu 12°C

V další fázi výzkumu byl vybrán komerčně dostupný a běžně používaný pufr pro mikročipovou elektroforézu, sloužící k vyplnění mikrokanálů [124 – 127]. Všechny testy byly provedeny s použitím pufru TRIS (tris[hydroxymethyl] aminoethane) od společnosti GE Healthcare. V souladu s pokyny na obalu byl připraven roztok o koncentraci 0,2 mol a hodnotě pH zvolené v závislosti na separovaných látkách v rozmezí od 7,2 do 9. Tabulka 8 ukazuje výsledky elektrické vodivosti připravených roztoků. Zkoumání hodnot pH a elektrické vodivosti bylo provedeno pomocí pH metru ELMETRON pH – meter CP – 407 s funkcí měření konduktance. Získané výsledky jsou aritmetickým průměrem z 5 měření.

Tab. 8 Měření konduktance roztoků pufru

Pufr Tris 0,2 mol	Konduktance [mS/cm]
pH 7,2	13
pH 8	10
pH 9	5,5

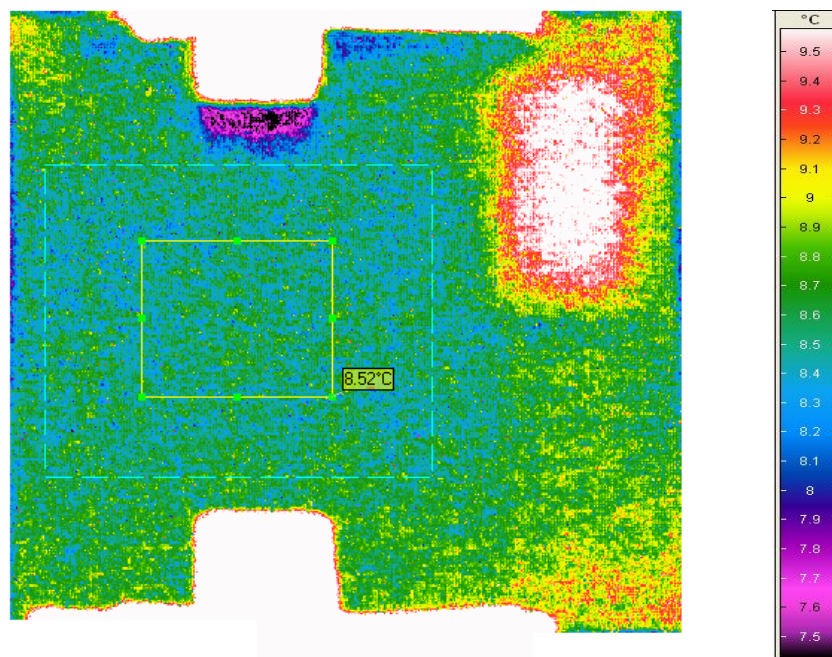
V průběhu realizace zkoumání bylo určeno množství generovaného Jouleova tepla v závislosti na hodnotě pH roztoku pufru. Tato studie byla zrealizovaná v makro škále v kanálu o čtvercovém průřezu o rozměrech 3,5x3,5x80 mm a objemu 1 ml. Kapilára byla připojena k platinovým elektrodám s přiváděným napětím 100 V. Měření teploty bylo provedeno pomocí rezistenčních snímačů Pt – 100. Provedené testy potvrdily závislosti významného nárůstu Jouleova tepla s funkcí poklesu hodnoty pH roztoku. Na obrázku 86 je uveden příklad výsledku změny množství vznikajícího Jouleova tepla s funkcí změny hodnoty pH roztoku.



Obr. 86 Závislost změny teploty s funkcí hodnoty pH roztoku [134]

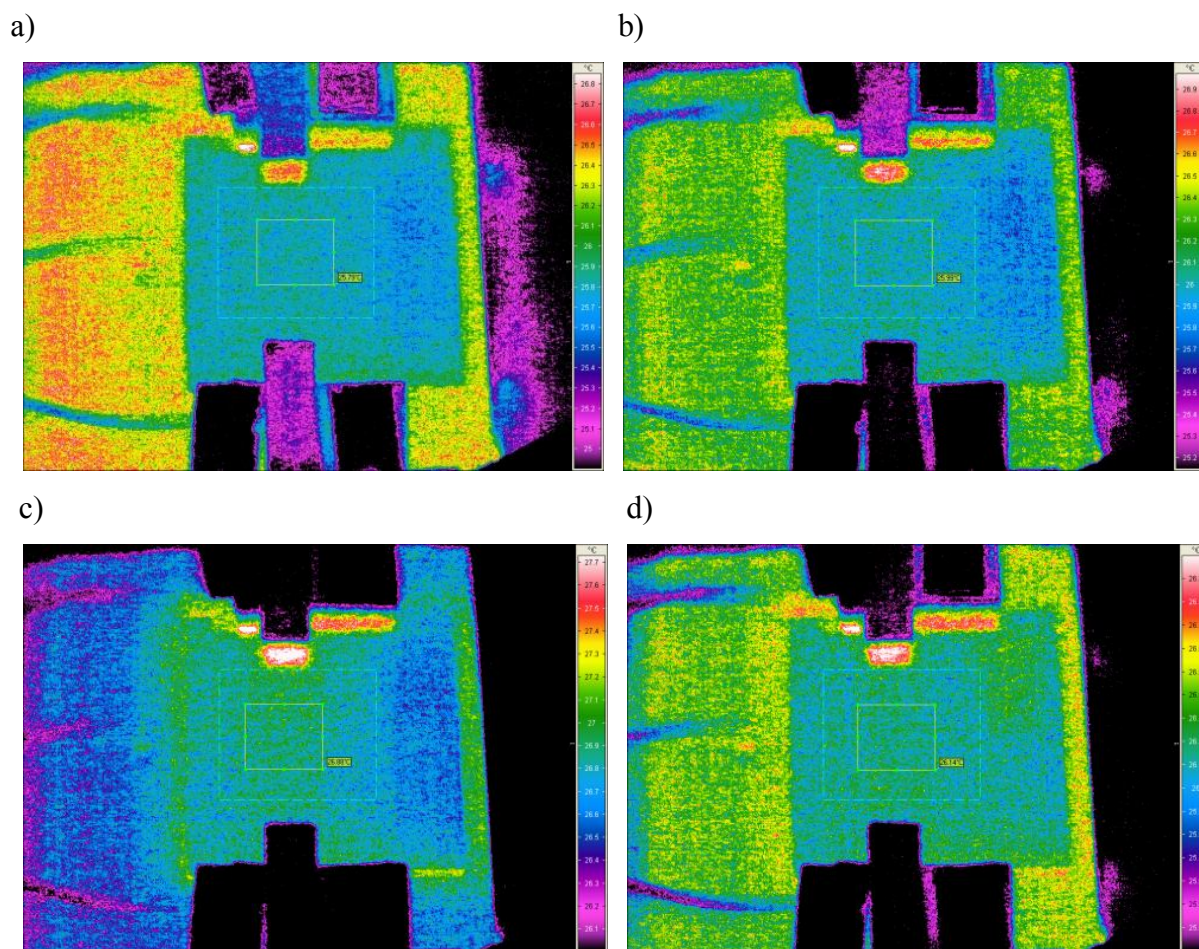
Diamantová mikrostruktura vyplněná pufrem projevila stejnou vlastnost jako obdélníkový kanál. Za účelem lepšího znázornění změn teploty a také z hlediska velmi rychlého přenosu tepla přes diamant byl k dalšímu zkoumání vybrán pufr o hodnotě pH 7,2 způsobující generování největšího množství Jouleova tepla.

V dalších etapách zkoumání bylo určeno rozložení teploty na povrchu mikročipu v průběhu chlazení v rozmezí od -2 do 24 s intervalem 2°C. Byl prozkoumán vliv přivedeného napětí na množství generovaného Jouleova tepla a také možnost jeho odvedení pomocí Peltierova článku. Na obrázku 87 je uveden příklad termogramu ukazující rozložení teploty na povrchu mikročipu chlazeného Peltierovým článkem na teplotu 8°C. Na obrázku je vidět stejnorodé rozložení teploty na povrchu, jen z pravé strany se vyskytuje teplotní přerušení způsobené přítomností zkušební struktury, která není zapojena do provozu zařízení. Plná charakteristika chlazení struktury je umístěna v příloze 6 této práce.



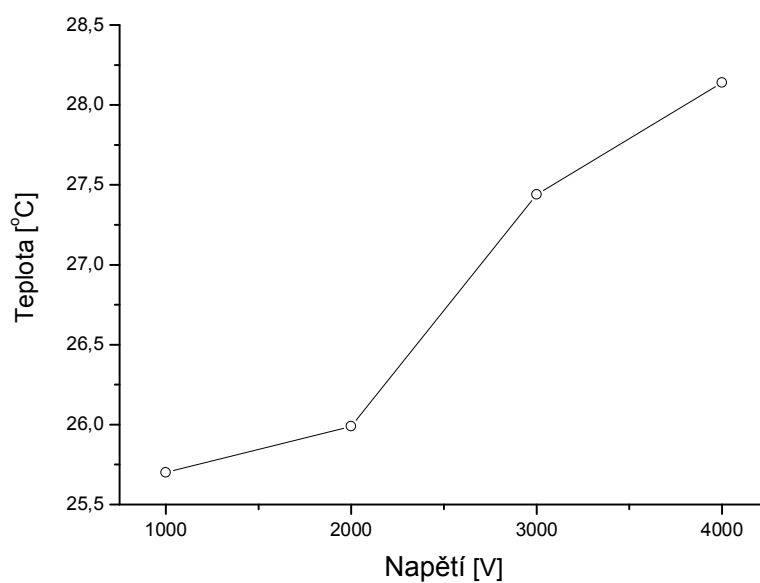
Obr. 87 Termogram ukazující rozložení teploty na povrchu mikročipu v průběhu chlazení na teplotu 8°C (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)

Při zobrazování pomocí termovizní kamery VarioCam nebylo v průběhu provedení simulovaného procesu elektroforézy vidět jednotlivé mikrokanály, ale pouze jednotný ohřev celé struktury ve funkci zvyšujícího se napětí s významnými místy zvýšené teploty nacházejícími se kolem anody. Získané výsledky měření teploty pro napětí 1, 2, 3, 4 kV jsou průměrnou hodnotou měření z oblastí označených obdélníkem na termogramech. Příklady výsledků jsou uvedeny na obrázku 88.



Obr. 88 Termogram zkoumané mikrostruktury s přivedeným napětím o hodnotě: a) 1000V; b) 2000V; c) 3000V; d) 4000V (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)

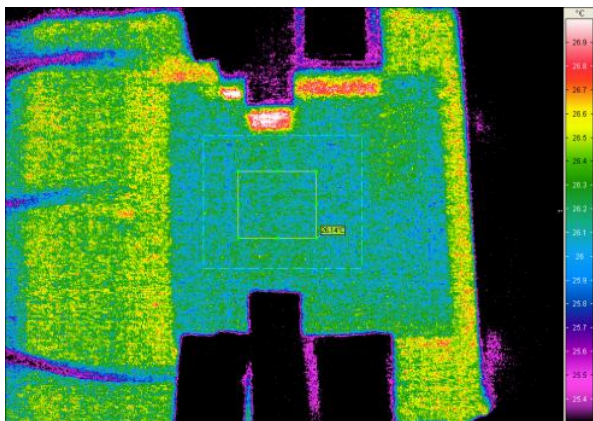
Na obrázku 89 je uvedeno zvýšení teploty ve funkci změny přiváděného napětí (od 1kV do 4kV).



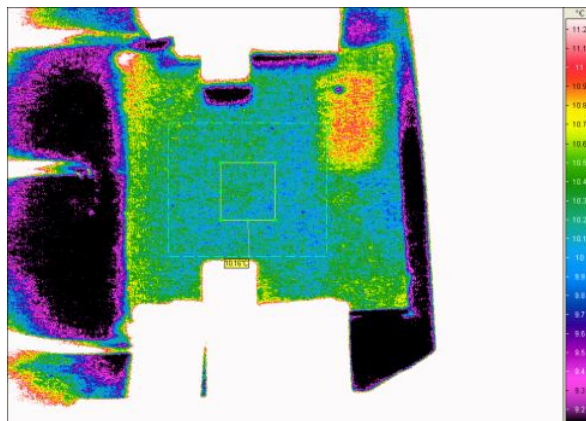
Obr. 89 Charakteristika teploty povrchu v závislosti na zvyšování napětí

Na obrázku 90 je uveden příklad termogramu zobrazujícího porovnání teploty v průběhu procesu mikročipové elektroforézy bez a s chlazením pomocí Peltierova článku. Parametry práce zařízení jsou: chlazení 10°C a přivedené napětí 4000 V. Získaná průměrná hodnota teploty z vybrané oblasti pro napětí 4000V je 26°C a při současném chlazení na teplotu 10°C je $10,46^{\circ}\text{C}$. Provedená charakteristika ukázala, že již při teplotě povrchu Peltierova článku 10°C , je vznikající Jouleovo teplo při 4 kV zcela odváděno.

a)

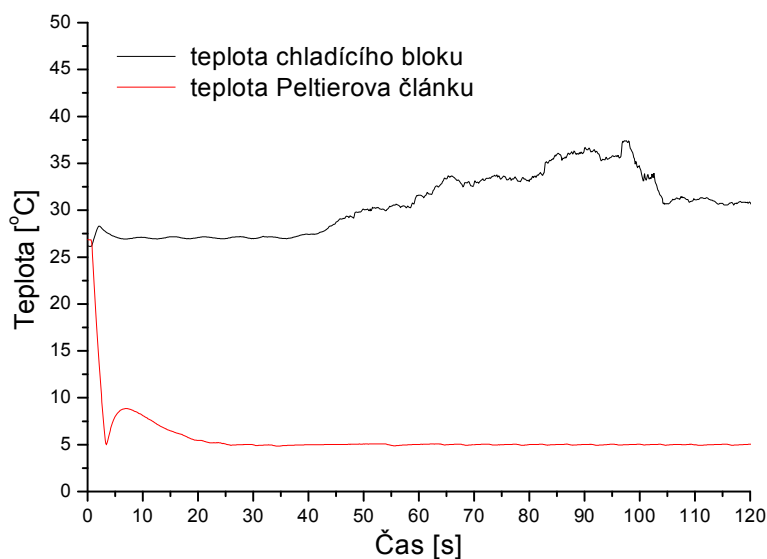


b)



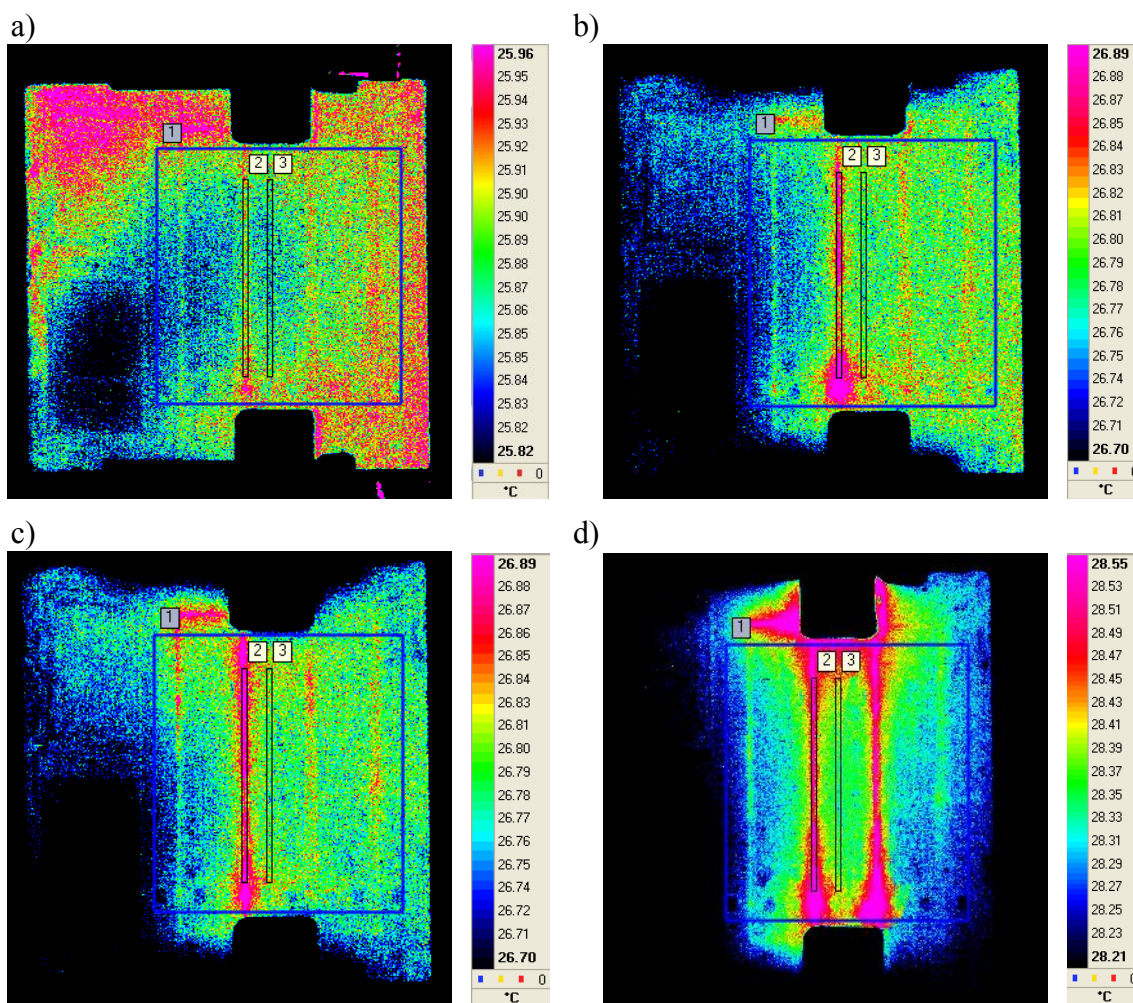
Obr. 90 Termogramy zkoumané struktury při přivedeném napětí 4000 V: a) bez chlazení b) s chlazením na teplotu 10°C (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)

V průběhu provedení zkoumání bylo pozorováno úplné odvedení vznikajícího nepříznivého Jouleova tepla. Tento výsledek potvrdila také řídicí jednotka Peltierova článku, která registrovala vzrůst teploty chladicího bloku prokazující jev odvodu tepla z mikročipu. Na obrázku 91 je uvedeno zvýšení teploty chladicího bloku v průběhu 40 sekund od zapojení vysokonapěťového zdroje.



Obr. 91 Odvádění tepla z mikročipu

Vzhledem k nedostatku viditelnosti jednotlivých mikrokanálů při použití kamery VarioCam byla v druhé fázi experimentů použita termovizní kamera Titanium sloužící k určení generování a odvodu Jouleova tepla. Kamera Titanium byla vybavena kroužky umožňujícími zaostření objektivu v režimu makro. Zkoumání bylo provedeno pro napětí 1; 1,5; 2; 2,5 kV. Pomocí této techniky byly pozorovány obrysy a také teplotní gradienty ohřívajících se mikrokanálů. Na obrázku 92 jsou zobrazeny termogramy ukazující místa lokálního ohřevu mikrostruktury.



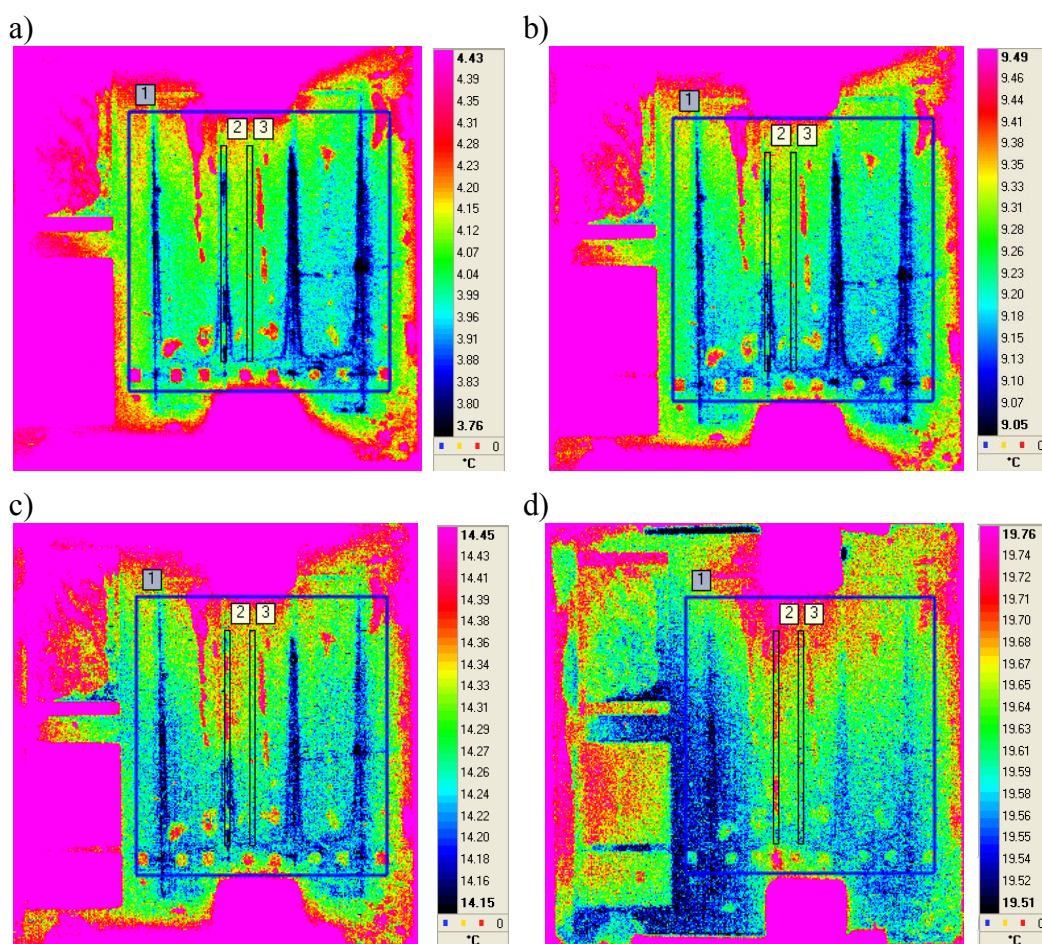
Obr. 92 Termogramy mikrokanálů s přivedeným napětím o hodnotě: a) 1 kV; b) 1,5 kV; c) 2 kV; d) 2,5 kV (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)

Na základě průzkumu byla stanovena průměrná teplota z oblastí označených obdélníky na termogramech. Oblasti měření byly definovány stejně pro všechna měření. V tabulce 9 jsou sestaveny teploty v závislosti na změně použitého napětí. Byly zjištěny teplotní rozdíly mezi kanálem a vedlejším povrchem, které se pohybovaly v rozmezí 0,1 – 0,15°C.

Tab. 9 Hodnota vzrůstu teploty ve funkci změny napětí

Napětí [V]	Teplota [°C]		
	Oblast 1	Oblast 2	Oblast 3
1000	25,89	25,97	25,87
1500	26,81	26,9	26,79
2000	27,19	27,44	27,29
2500	28,34	28,51	28,37

V další etapě zkoumání bylo provedeno chlazení a určen jeho vliv na rozložení teploty v mikročipu. Měření bylo provedeno pro generované Jouleovo teplo odpovídající napětí 1; 1,5; 2; 2,5 kV se současným chlazením 5, 10, 15 a 20°C. Na obrázku 93 jsou uvedeny příklady výsledků pro napětí 2 kV s chlazením 5, 10, 15 a 20°C. Další výsledky jsou umístěny v příloze 7 této práce.



Rys. 93 Termogramy mikrokánálů s přiváděným napětím o hodnotě 2 kV se současným chlazením na teplotu: a) 5°C; a) 10°C; a) 15°C; a) 20°C (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)

V tabulce 10 jsou uvedeny příklady výsledků chlazení mikrostruktury pro přivedené napětí 2 kV. Získané výsledky teplot jsou průměrnou hodnotou z oblastí označených na obrázku 93.

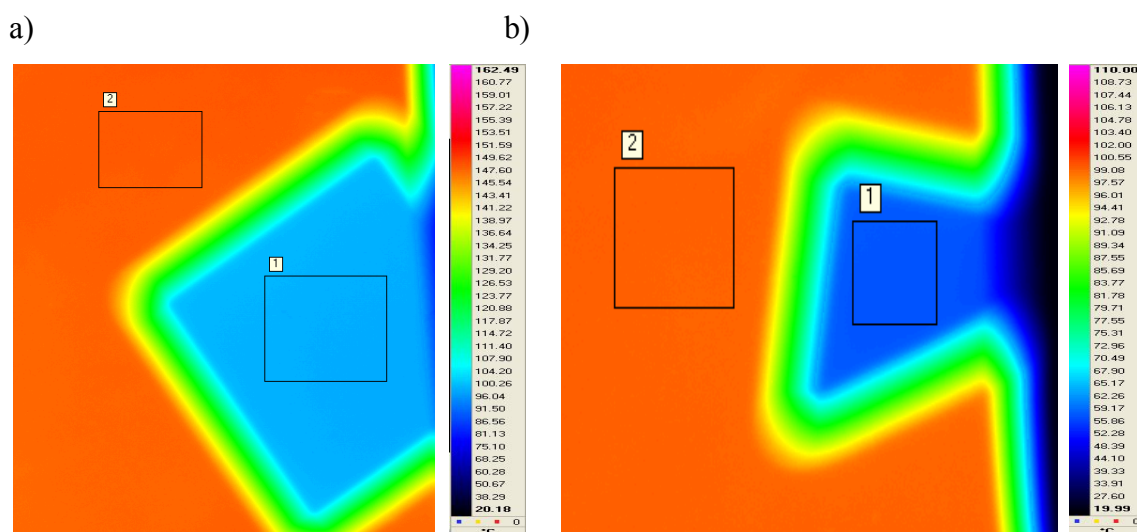
Tab. 10 Výsledky chlazení mikročipu

Chlazení [°C]	Teplota povrchu mikrokanálu [°C]
5	4,04
10	9,24
15	14,27
20	19,61

Provedené zkoumání potvrdilo, že při chladicí teplotě 20°C je generované Jouleovo teplo při 2 kV zcela odvedeno.

Provedená analýza systému založená na použití diamantu je charakteristická účinným a rychlým odvodem tepla, což vede k získávání příznivých tepelných podmínek v průběhu mikročipové elektroforézy. Veškerý prováděný výzkum byl založen na měření teploty povrchu přístroje. Termovizní kamery určují infračervené záření dopadající do detektoru [135]. Z toho důvodu bylo v průběhu zkoumání rozhodnuto určit teplotu v mikrokanálech. Bylo nutno uvažovat součinitel transmitance krytu uzavírajícího mikrostrukturu. Vzhledem k malé vzdálenosti mezi kamerou a zkušebním vzorkem (přibližně 15 cm) byl vynechán vliv součinitele atmosféry. Tato studie byla navržena za účelem pokusu stanovení určité teploty přímo v mikrokanálu metodou eliminace infračerveného tlumení přes kryt s PDMS těsněním. Pomocí kamery Titanium byla změřena hodnota součinitele transmitance materiálu krytu zařízení. Prvním vzorkem pod označením „A” bylo křemenné sklo o tloušťce 500 μm. Dalším vzorkem s označením „B” bylo křemenné sklo o stejné tloušťce, které mělo na svém povrchu vyrobeno těsnění z PDMS o tloušťce 70 μm. Analýza umožnila určení součinitele transmitance zkoumaných materiálů, díky čemuž byla možná nivelace vlivu tlumení infračerveného záření na výsledky měření teploty na povrchu křemenného krytu. Ke zkoumání byl použit model absolutně černého tělesa Precision Infrared Calibrator 4181 společnosti Fluke jako referenční povrch se stabilní teplotou (v průběhu měření 100°C) a termovizní kamera Titanium. Koeficient emisivity zkoumaných povrchů použitého absolutně černého těla byl 0,95. Zkoumání spočívalo na zavedení testovaného vzorku mezi objektiv kamery a model absolutně černého těla a registraci teplotních rozdílů na jednotlivých površích. Na obrázku 94 a je uveden termogram, na kterém jsou pomocí obdélníků znázorněny oblasti měření, ze kterých byla určena průměrná teplota. Následně byla pomocí softwaru kamery vybrána hodnota součinitele transmitance z oblasti 1 (sklo) tak, aby hodnota

průměrné teploty měřená v této oblasti byla co možná nejbližší teplotě modelu absolutně černého těla (100°C). Podobný postup byl proveden v případě obrázku 94 b. Uvedený termogram je prezentován před výběrem hodnoty součinitele transmitance v kameře, a proto je změřená teplota v oblasti 1 mnohem nižší, než teplota scény. Tabulka 11 ukazuje výsledky zkoumání transmitance jednotlivých vzorků. Výhodou této studie, ve srovnání s konvenčními spektroskopickými technikami je, že získaný výsledek je průměrnou hodnotou z celého povrchu zkoumaného vzorku. Získané výsledky součinitele transmitance pro testované vzorky jsou považovány za orientační z hlediska vlivu odrazů, které jsou opomenuty.



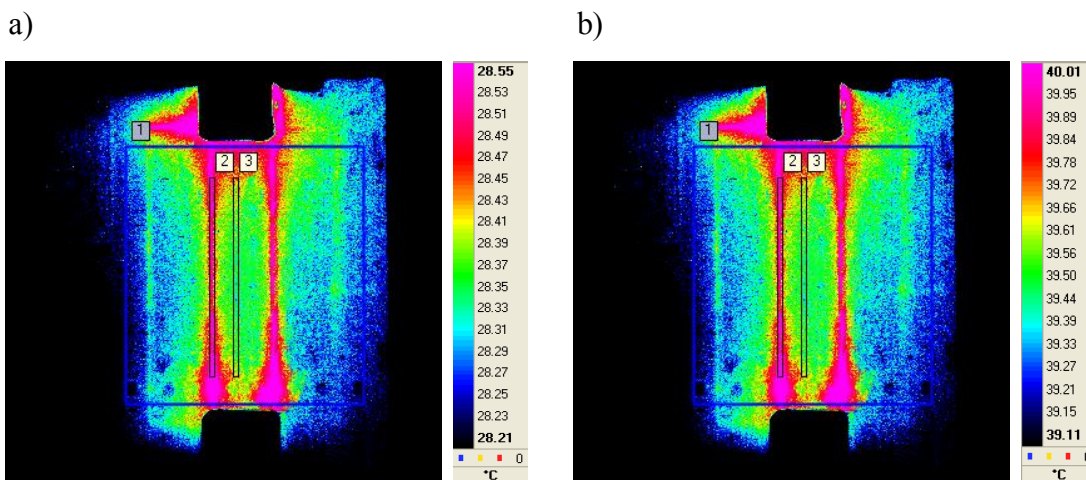
Obr. 94 Termogramy: a) pro křemenné sklo (oblast 1) po korekci vlivu součinitele τ , b) pro křemenné sklo s PDMS těsněním (oblast 1) před korekcí vlivu součinitele τ , na pozadí scény absolutně černého těla (oblast 2), (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)

Tab. 11 Stanovení hodnoty součinitele transmitance měřením teplotních rozdílů

Druh vzorku		Teplota z vybrané oblasti [$^{\circ}\text{C}$]			Hodnota součinitele transmitance
		Min	Max	Průměr	
Vzorek A	1 oblast	99,11	100,62	99,72	0,36
	2 oblast	147,45	148,17	147,86	
Vzorek B	1 oblast	58,11	58,92	58,34	0,29
	2 oblast	98,81	99,24	99,04	

Cílem provedeného zkoumání bylo vzít v úvahu transmitance vyrobeného krytu pro mikročip. Toto řešení umožnilo určit přibližnou teplotu přímo uvnitř mikrokanálu. Na obrázku 95 a je uveden příklad termogramu ukazující rozložení teploty na povrchu křemenného krytu bez

korekce vlivu tlumení IR záření, na obrázku 95 b je uveden s ohledem na korekci tlumení IR záření krytu. Získaný termogram byl zaznamenán při přivedeném napětí 2500 V.



Obr. 95 Termogramy: a) měření na povrchu krytu bez korekce, b) měření s korekcí součinitele transmitance krytu (zaznamenané pomocí kamery Titanium)

Z provedeného zkoumání byla získána průměrná hodnota teploty 28,51°C pro povrch mikrokanálu označený na obrázku 95 a jako oblast 2, nicméně pro zkoumání z korekcí součinitele transmitance (obrázek 95 b) pro stejné oblasti byla získána hodnota 39,95 °C. Uvedené termogramy jsou vybaveny stejnou paletou barev, ačkoliv mají různé teplotní škály.

6. Diskuze výsledků

Cílem této disertační práce bylo vytvoření zařízení, které by zajistilo příznivější podmínky v průběhu provedení mikročipové elektroforézy díky snížení teploty a její planarizaci uvnitř mikrokanálů. Mikročip vyrobený z materiálu o vysoké tepelné vodivosti daleko lépe odvádí teplo, vznikající během procesu elektroforézy, ve srovnání s komerčně dostupnými mikročipy ze skel nebo polymerů [8]. Ve spojení s přijímáním tepla Peltierovým článkem, je tato sestava kompletním řešením vedoucím k výraznému zlepšení teplotních podmínek během procesu elektroforézy, provedeném na diamantovém mikročipu. Koncept vyrobeného zařízení spočívá v provedení elektroforetických rozvodů v mikrokanálech vytvořených v diamantu. Přístroj je vyroben tak, aby měl hlavní kanály, ve kterých se provádí elektroforetická separace, a také boční kanály protínající hlavní kanály sloužící k zavedení zkoumaných látek například pomocí metody vynuceného proudění. Všechny kanály jsou uzavřené mikrozásobníky pro snadné vyplňování struktury pufrů a připojování elektrod. Průtok proudu přes pufr (o relativně vysoké rezistenci MΩ) způsobuje pohyb biologických částic nacházejících se v biologickém vzorku. Molekuly o větší hmotnosti a menším



elektrickém náboji se pohybují podél mikrokanálu pomaleji, než částice nižší hmotnosti s větším elektrickým nábojem. Na tomto základě s použitím různých detektorů můžeme definovat zkoumané látky. Mezi základní metody detekce běžně uváděné v literatuře patří například metody: elektrochemická detekce, fluorescence, optická absorpce, luminiscence, Ramanova spektroskopie, hmotnostní spektroskopie [136]. Tok proudu přes mikrokanál v průběhu elektroforézy je jedním z hlavních omezení, protože způsobuje zvětšení teploty v jeho vnitřní části (Jouleovo teplo). Tento jev omezuje možnost použití vyšších napětí, jehož účinkem je možné zkrácení doby analýzy. Velmi dobré tepelné a optické vlastnosti diamantu, dobře známé a rozsáhle popsané v literatuře [137], byly motivací k vyrobení elektroforetického mikročipu z polykrystalického diamantu. Před přistoupením k vytvoření diamantového elektroforetického mikročipu byla provedena řada počítačových simulací pomocí komerčně dostupného programu ConventorWareTM. Provedené zkoumání potvrdilo podstatnou převahu diamantu ve srovnání s materiály, ze kterých se standardně vyrábí elektroforetické mikročipy. Po analýze získaných výsledků bylo dále přistoupeno k etapě vytvoření elektroforetického mikročipu z polykrystalického diamantu.

Navržená a postavená měřicí soustava byla založená na mikročipu vyrobeném z diamantu spojeném s Peltierovým článkem sloužícím k odvedení vznikajícího tepla během procesu elektroforézy. Chladicí jednotka, řízená počítačem, zajišťovala plynulý a stabilní provoz zařízení. V průběhu tohoto procesu bylo možné udržovat konstantní teplotu a také plnou kontrolu a evidenci chladicích parametrů.

Vyvinutá technologie výroby diamantové mikrostruktury, popsaná v této práci, byla založená na použití metody repliky. Byly vyvinuty a vybrány technologické parametry, při kterých bylo možné získání křemíkové matrice o odpovídajících geometrických rozměrech. Optimalizovány byly také parametry procesu depozice (osazování) polykrystalické diamantové vrstvy na křemíkové matici.

V této práci byla provedena analýza získané geometrie mikrostruktury a morfologie povrchu, která umožnila určení stupně geometrické shody diamantu a křemíkové matrice. Toto zkoumání bylo realizováno pomocí SEM a CLSM metody. Geometrické rozměry návrhu a získaného tvaru se od sebe liší. Je to s největší pravděpodobností způsobeno následujícími fyzikálně – chemickými jevy vyskytujícími se v průběhu vytváření matrice: podsvícení emulze, boční (laterální) leptání křemíku na okraji krycí vrstvy SiO₂/Al, naklonění bočních stěn křemíkové struktury. Získaný úhel vychýlení je $\pm 1^\circ$, což na vzdálenosti 250 μm vyjadřuje odchylku v rozměru kolem 2,75 μm . Provedené SEM zkoumání umožnilo definování vad

(poruch) a povrchových poškození mikrostruktury, a také určení geometrických tvarů. Vyrobená struktura měla na povrchu několik odštípnutí způsobených hlavně mechanickým poškozením. Získané průměrné hodnoty šířek mikrokanálů jsou v pořadí pro: hlavní mikrokanál $43 \pm 4 \text{ } \mu\text{m}$, spojující mikrokanál $191 \pm 18 \text{ } \mu\text{m}$ a mikrozásobník $950 \pm 9 \text{ } \mu\text{m} \times 950 \pm 9 \text{ } \mu\text{m}$. Zkoumání provedené pomocí CLSM metody prokázalo lichoběžný tvar mikrokanálů s rozšířením směřujícím od spodní základny. Získané průměrné hodnoty šířek (dolní a horní strany mikrokanálu) a také hloubky mikrokanálů jsou v pořadí pro: hlavní mikrokanál $41,6 \pm 1,8$ a $48,3 \pm 3,6 \text{ } \mu\text{m}$, spojující mikrokanál 192 ± 1 a $202,6 \pm 2 \text{ } \mu\text{m}$, mikrozásobník $985 \pm 1,5$ a $998 \pm 1 \text{ } \mu\text{m}$ a také hloubku mikrostruktury v rozmezí od $252,3 \pm 4$ do $257,6 \pm 6,6 \text{ } \mu\text{m}$. Získané výsledky geometrie mikrokanálů z těchto dvou analýz se mezi sebou významně liší. Jako správné byly přijaty výsledky konfokální laserové mikroskopie. V průběhu SEM pozorování bylo obtížné zvolit vybrané oblasti měření (hran mikrokanálů) z hlediska nepatrného naklonění bočních stěn. Dalším faktorem, který mohl mít vliv na přesnost měření, mohla být kolmost uchycení vzorku, vzhledem k dráze elektronového paprsku. Provedené zobrazování příčných řezů pomocí CLSM metody potvrdilo sklon bočních stěn a umožnilo jednoznačně určit šířky a hloubky jednotlivých elementů struktury. Zkoumání drsnosti provedené pomocí CLSM metody na dně mikrokanálu ukázalo průměrnou hodnotu parametru R_a ve výši $0,0128 \pm 0,005 \text{ } \mu\text{m}$. Hodnota drsnosti R_a nakoupených křemíkových destiček byla $0,0005 \text{ } \mu\text{m}$. Získaný výsledek je o dva řady vyšší, než je registrován pro matrici, ovšem blízce koresponduje údajům uváděným v literatuře. Pizzo a jeho kolektiv, rovněž ukazují podobné výsledky repliky křemíku diamantem [107]. Analýza fyzikálně-chemických a mechanických vlastností byla provedena pomocí technik XPS, EDX, měření SEP a také nanoindentace. Výsledky XPS prokázaly přítomnost uhlíku, kyslíku a dusíku na povrchu mikročipu. Provedená analýza spekter ve vysokém rozlišení umožnila určení jednotlivých vazeb. Pro uhlík C1s byly získány vazby C–C sp^3 (285 eV), –C–H, C–N, (286 eV), –C=O (288 eV), –C–O– (287,2 eV) [128 – 131]. Vysoce rozlišené spektrum N1s bylo charakterizováno nízkou intenzitou píku a také jeho velkou šířkou. Může to znamenat výskyt vazeb C–N dvojitých a trojitých. Analýza O1s také prokázala dva stavy s rozdíly kolem 1eV pro C–O i C=O. Z provedené analýzy O1s a N1s lze konstatovat, že s největší pravděpodobností jsou atomy dusíku a také kyslíku vázány s nediamantovými druhy uhlíku podél povrchu hranic zrn. Výsledek spektroskopie charakteristických energetických ztrát elektronů EELS píku C1s ukázal spektrum velmi podobné jednoduchému krystalu. Široká rezonance π – π^* o nízké intenzitě v rozmezí od 9 do 13 eV ukazuje přítomnost vazeb sp^2 amorfního uhlíku (pouze na

povrchu) [132]. Provedená analýza EDX byla provedena v bodě, a také podél linie kolmé k mikrokanálu. Výsledky bodového zkoumání poukazují pouze na přítomnost uhlíku na povrchu mikrokanálu, zatímco lineární analýza prokázala výskyt velmi malého množství křemíku nacházejícího se na okraji mikrokanálu. Přítomnost tohoto prvku je vysvětlována nepřesností leptání křemíkové matrice, na které byla deponovaná diamantová vrstva. Zkoumání úhlu smáčení provedené v 90-ti denních intervalech ukázalo tendenci změny charakteru povrchu z hydrofobního ve směru hydrofilním. Volná povrchová energie vypočtená na základě změny úhlu smáčení se snižuje v čase. Nejmenší hodnota SEP, a zároveň nejslabší vlastnosti adheze, byla získána pro vzorky po době 180 dnů. Tato vlastnost je přičtená oxidaci povrchu [29]. Z výsledků nanoindentace bylo možné určit hodnoty tvrdostí ($85,1 \pm 10,2$ GPa) a Youngova modulu pružnosti ($1114,5 \pm 183,8$ GPa) zkoumaného vzorku. Získané výsledky silně korelují s výsledky obdrženyými Chowdhurym a jeho kolektivem pro nedopovaný polykrystalický diamant [138]. Poměrně velká odchylka měření byla způsobena vysokou tvrdostí materiálu, jehož tvrdost byla podobná tvrdosti indentoru. V průběhu měření docházelo ke geometrické změně tvaru penetrátoru vzniklé jeho opotřebením při průchodu vzorkem.

V rámci analýzy fázového složení bylo v této práci provedeno zkoumání pomocí Ramanovy spektroskopie a difrakce rentgenových paprsků. Ramanova studie provedená v různých místech potvrdila homogenitu získané diamantové struktury. Na spektrech byl zaznamenán samotný pík pro 1332 cm^{-1} odpovídající diamantové fázi s rozdíly posunutí píku menšími než $0,7\text{ cm}^{-1}$. Parametr šířky v polovině maxima, získaný pro vrstvy polykrystalického diamantu, uvedený Agerem a jeho kolektivem je od 5 do 15 cm^{-1} [139]. V této práci je prezentovaný parametr FWHM zkoumaného diamantu, který se nachází v rozmezí od $3,5$ do $3,9\text{ cm}^{-1}$. Tento faktor prokazuje vysokou kvalitu a stupeň krystalinity vyrobené vrstvy [140]. Komplementárním zkoumáním potvrzujícím krystalinitu a uspořádání struktury byla difrakce rentgenových paprsků XRD. Byl pozorován význačný směr krystalografické orientace zkoumaného materiálu (220), který označuje výskyt textury analyzovaného vzorku.

Provedená analýza tepelných vlastností umožnila určení součinitele tepelné vodivosti λ v rozmezí od 1040 do $1280\text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$. Získané hodnoty jsou podobné hodnotám uváděným v literatuře, které jsou změřeny ve stavu tepelné rovnováhy technikou tepelného toku. Wörner a kolektiv [141] vykázal pro diamantové vzorky CVD, o tloušťce v rozmezí od 50 do $172\text{ }\mu\text{m}$, široký rozsah tepelné vodivosti od 700 do $2000\text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$. S vědomím, že získaná diamantová

mikrostruktura má anizotropní vlastnosti (sloupcová struktura), je možné očekávat zvýšení tepelné vodivosti ve směru kolmém k povrchu.

Vysoká kvalita vyrobeného diamantového polykrystalického mikročipu byla rovněž potvrzena analýzou optických vlastností pomocí spektroskopie UV-Vis. Vysoká absorbance je patrná v celém rozsahu vlnových délek. Nicméně, zaznamenaná spektra dobře odpovídají spektrům získaným Mokunovem a jeho kolektivem [142] pro nedopované jednotlivé krystaly diamantu vyrobené metodou CVD. Absorpční pás při 222 nm umožnil výpočet energie zakázaného pásu, který činil 5,58 eV pro zkoumaný materiál. Tato hodnota je srovnatelná s dobře známou hodnotou uváděnou v literatuře, což je 5,5 eV [143,144]. Nepatrné rozdíly pravděpodobně vyplývají z různých metod odhadu energetických mezer. Korelace získaných výsledků a hodnot uváděných v literatuře je blízká. S cílem snížení podílu rozptylu v absorpčních spektrech, byla použita integrující koule. Dle očekávání, rozptyl silně oslabuje získané maximum při 222 nm. Podobné pásmo z maxima při 222 nm bylo nalezeno Altukhovem a jeho kolektivem [144] ve spektru fotocitlivostí fotodetektoru postaveného z přírodního diamantu. Odhadovaná energetická mezera srovnatelná s literárním tvrzením pro nedopované diamantové krystaly, potvrdila absenci nečistot ve vyrobeném mikročipu.

V rámci této disertační práce byla provedena analýza rozložení teploty v diamantovém mikročipu pomocí termovizních kamer. Bylo prokázáno získání příznivějších rozložení hodnot teploty použitím materiálu o vysoké tepelné vodivosti ve spojení s Peltierovým článkem sloužícím k odvedení generovaného Jouleova tepla během průběhu mikročipové elektroforézy. V této práci, s cílem určení generovaného tepla, byl zvolen a charakterizován pufr k provedení elektroforézy v mikrokánálech. Byl použit Triss o hodnotě pH 7,2 charakterizující se největší elektrickou vodivostí 13 mS/cm. Tento výběr byl vhodný pro nejvýraznější vizualizaci tepelných změn probíhajících ve struktuře (nejvyšší hodnota generovaného tepla). Zpracovaná chladicí soustava ve spojení s diamantovým mikročipem umožnila rychlé odvedení tepla. Během výzkumu bylo zjištěno, že již při chladicí teplotě 20°C je Jouleovo teplo vznikající při 2 kV zcela odvedeno. Byla pozorována také místa lokálního ohřevu umístěná v okolí elektrod (hlavně anody). Dále byly zjištěny tepelné rozdíly mezi mikrokánaly a jejich vzájemný ohřev (zvýšené teploty ve vnitřních mikrokánalech). V průběhu tepelných analýz byla registrovaná teplota na povrchu krytu mikročipu. V rámci této práce byla určena také teplota uvnitř mikrokánalu odstraněním tlumení infračerveného záření způsobeného transmitancí krytu. Byly zaznamenány značné rozdíly teploty (kolem 11 °C) mezi vybranou oblastí uvnitř mikrokánalu a povrchem krytu. Wu a jeho kolektiv [145]



rovněž popisují jevy spojené s Jouleovým teplem vznikajícím v mikrokanálech. Prokázali tři aspekty vzrůstu teploty – obecné zvýšení teploty roztoku pufru uvnitř mikrokanálu, radiální teplotní gradient uvnitř mikrokanálu a také nestejnorodé rozložení distribuce tepla v axiálním směru.

Závěrem je třeba dodat, že použití materiálu s vysokou tepelnou vodivostí v kombinaci se navrženým chlazením výrazně zlepšuje tepelné podmínky během elektroforetických procesů provedených s použitím mikročipů. Díky tomuto řešení můžeme urychlit procesy elektroforézy a zlepšit kvalitu získávaných výsledků. Další výhodou předloženého zařízení je chemická odolnost diamantu, který může být použitý i pro vysoce agresivní činidla.

7. Závěry

V rámci této práce bylo navrženo a vytvořeno zařízení pro mikročipovou elektroforézu z polykrystalického diamantu spojeného s chladicím systémem pracujícím na základě Peltierova článku. Byla vypracována metodika využitelnosti mikročipu a podána komplexní charakteristika parametrů vyrobeného přístroje.

Provedené experimenty a získané výsledky zkoumání umožňují stanovit následující závěry:

- Na základě získaných výsledků tepelné vodivosti mikrostruktury z polykrystalického diamantu bylo zjištěno, že polykrystalický diamant vyrobený metodou MPCVD je materiálem výrazně lepším, ve srovnání se sklem a plasty používanými v současné době pro mikročipovou elektroforézu.
- Chladicí soustava, založená na Peltierovu článku, umožnila účinné odvedení generovaného Jouleova tepla.
- Chladicí soustava, založená na Peltierovu článku, zajistila udržování konstantní teploty v průběhu procesu mikročipové elektroforézy.
- Použití diamantového elektroforetického mikročipu, chlazeného Peltierovým článkem, mělo za následek snížení relativně velkých teplotních gradientů podél mikrokanálů.
- Negativní vliv vzájemného ohřevu sousedních mikrokanálů, způsobující vyšší teploty vnitřních mikrokanálů, může být ovlivněn použitím Peltierova článku určeného k chlazení diamantového mikročipu.
- Využití diamantu v mikročipové elektroforéze, v kombinaci s chladicím systémem, dovolují snížení oblastí zvýšené teploty, která se nachází v okolí mikrozásobníků, ke kterým jsou připojeny elektrody.

Na základě uvedených závěrů lze konstatovat, že položená teze práce je dokázána.



8. Literatura

- [1] B. Walkowiak, V. Kochmańska, Elektroforeza przykłady zastosowań, Opracowanie zbiorowe pod redakcją Bogdana Walkowiaka i Violetty Kochmańskiej, (2002)
- [2] J. Hassard, Deltadot Limited (GB), London, Patent, Capillary electrophoresis device No. PCT/GB99/00742, filed Mar. 12, (1999)
- [3] S.C.Terry, J.H. Jerman, J.B. Angell, A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. IEEE Trans. Electron. Devices 26, 880 – 886, (1979)
- [4] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fettingier, A. Paulus, H. Luedi, H.M. Widmer, Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. Capillary electrophoresis on a chip. J. Chromatogr. 593, 253 – 258, (1992)
- [5] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Ludi, H.M. Widmer, Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip, Analytical Chemistry, Volume 64, Issue 17, 1926 – 1932, (1992)
- [6] A.T. Woolley, R.A. Mathies, Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. Anal. Chem. 67, 3676 – 3680, (1995)
- [7] J. A. Gawron, R. M. Scott, S. M. Lunte, Microchip electrophoretic separation systems for biomedical and pharmaceutical analysis, European Journal of Pharmaceutical Sciences 14, 1 – 12, (2001)
- [8] A. T. Karczemska, D. Witkowski, V. Ralchenko, A. Bolshakov, D. Sovyb, J. M. Łysko, M. Fijałkowski, J. Bodzenta, J. Hassard Diamond electrophoretic microchips – Joule heating effects, Materials Science and Engineering B 176, 326 – 330, (2011)
- [9] D. Wu, J. Qin, B. Lin, Electrophoretic separations on microfluidic chips, Journal of Chromatography A, 1184, 542 – 559, (2008)
- [10] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Microchip devices for high-efficiency separations. Anal. Chem. 72, 5814 – 5819, (2000)
- [11] H. Nagata, M. Tabuchi, K. Hirano, Y. Baba, Automatic Protein Separation by Microchip Electrophoresis Using Quartz Chip, Chromatography, Vol. 26 No. 1, (2005)
- [12] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B.Koutny, R.J.Warmack, J.M. Ramsey, Effects of Injection Schemes and Column Geometry on the Performance of Microchip Electrophoresis Devices Anal. Chem. 66, 1107 – 1113, (1994)
- [13] S.C. Jacobson, S.V. Ermakov, J.M. Ramsey, Minimizing the Number of Voltage Sources and Fluid Reservoirs for Electrokinetic Valving in Microfluidic Devices, Anal. Chem. 71, 3273 – 3276, (1999)
- [14] H. Cui, Z. Huang, Prashanta Dutta, and Cornelius F. Ivory, Automated Electric Valve for Electrokinetic Separation in a Networked Microfluidic Chip, Anal. Chem. 79, 1456 – 1465, (2007)
- [15] C.X. Zhang, A. Manz, Narrow sample channel injectors for capillary electrophoresis on microchips, Anal. Chem. 73, 2656 – 2626, (2001)
- [16] C.H. Tsai, Y.N. Wang, C.F. Lin, R.J. Yang, L.M. Fu, Experimental and numerical analysis of leakage effect for injectors in microfluidic device. Electrophoresis 27, 4991 – 4998, (2006)



- [17] Y. Luo, D.P. Wu, S.J. Zeng, H.W. Gai, Z.C. Long, Z. Shen, Z.P. Dai, J.H. Qin, B.C. Lin, Double – cross hydrostatic pressure sample injection for chip CE: Variable sample plug volume and minimum number of electrodes, *Anal. Chem.* 78 6074 – 6080, (2006)
- [18] L. Zhang, X.F. Yin, Z.L. Fang, Effect of operation conditions on vacuum membrane distillation performance for epoxy resin wastewater, *Lab Chip* 6, 258 – 262, (2006)
- [19] J.M. Karlinsey, J. Monahan, D.J. Marchiarullo, J.P. Ferrance, J.P. Landers, Pressure injection on a valved microdevice for electrophoretic analysis of submicroliter samples *Anal. Chem.* 77, 3637 – 3643, (2005)
- [20] S.C Jacobson, R Hergenröder, L.B Koutny, R.J Warmack, J.M Ramsey Effects of injection schemes and column geometry on the performance of microchip electrophoresis devices, *Anal. Chem.*, 66, 1107 – 1113, (1994)
- [21] C. A. Emrich, H. J. Tian, I. L. Medintz, and R. A. Mathies, "Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis", *Anal. Chem.*, vol. 74, 5076 – 5083 , (2002)
- [22] S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenröder, A.W. Moore Jr., J.M. Ramsey, Serialto-parallel interfaces for efficient sample transfer on microfluidic devices, *Anal. Chem.* 66, 3472 – 3481, (1994)
- [23] R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, Generating electrospray from microchip devices using electroosmotic pumping, *Anal. Chem.* 69, 1174 – 1178, (1997)
- [24] B. Zhang, H. Liu, B.L. Karger, F. Foret, Microfabricated devices for capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71, 3258 – 3264, (1999)
- [25] B. Zhang, F. Foret, B.L. Karger, A microdevice with integrated liquid junction for facile peptide and protein analysis by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72, 1015 – 1022, (2000)
- [26] B. Zhang, F. Foret, B.L. Karger, High-throughput microfabricated CE/ESI-MS: automated sampling from a microwell plate, *Anal. Chem.* 73, 2675 – 2681, (2001)
- [27] X. Mao, I.K. Chu, B. Lin, A sheath-flow nanoelectrospray interface of microchip electrophoresis MS for glycoprotein and glycopeptide analysis, *Electrophoresis* 27 5059 – 5067, (2006)
- [28] D. F. Pozo-Ayuso, M. Castano-Alvarez, A. Fernandez-la-Villa, M. Garcia-Granda, M. T. Fernandez-Abedul, Agustin Costa-Garcia , Jose Rodriguez-Garcia, Fabrication and evaluation of single- and dual-channel (II-design) microchip electrophoresis with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 1180 193 – 202, (2008)
- [29] H. Bjorkman, C. Ericson, S. Hjerten, K. Hjort, Diamond microchips for fast chromatography of proteins, *Sensors and Actuators B* 79, 71 – 77, (2001)
- [30] Z. Liang, N. Chiem, G. Ocvirk, T. Tang, K. Fluri, D.J. Harrison, Microfabrication of a planar absorbance and fluorescence cell for integrated capillary electrophoresis devices. *Anal. Chem.* 68, 1040 – 1046, (1996)
- [31] I.M. Lazar, R.S. Ramsey, S. Sundberg, J.M. Ramsey, Subattomole-sensitivity microchip nanoelectrospray source with time-of-flight mass spectrometry detection. *Anal. Chem.* 71, 3627 – 3631, (1999)
- [32] B. Zhang, H. Liu, B.L. Karger, F. Foret, Microfabricated devices for capillary electrophoresis–electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71, 3258 – 3264, (1999)

- [33] F. Kitagawa, K. Otsuka, Recent progress in microchip electrophoresis–mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 668–678, (2011)
- [34] R.S. Martin, A.J. Gawron, C.S. Henry, S.M. Lunte, Dual electrode detection on poly(dimethylsiloxane)-fabricated microchips. *Anal. Chem.* 72, 3196 – 3202, (2000)
- [35] J. Wang, B. Tian, E. Sahlin, Article Micromachined Electrophoresis Chips with Thick-Film Electrochemical Detectors, *Anal. Chem.*, 71 (23), 5436 – 5440, (1999)
- [36] J. Zhao, Z. Chen, X. Li, J. Pan, A novel microchip based on indium tin oxide coated glass for contactless conductivity detection, *Talanta* 85, 2614 – 2619, (2011)
- [37] P. D. Grossman, J. C. Colburn, *Capillary Electrophoresis Theory and Practise* ISBN 0-12-304250-X, Academic Press, Inc., (1992)
- [38] J. Liu, C. Hansen, S.R. Quake, Solving the "world-to-chip" interface problem with a microfluidic matrix, *Anal. Chem.* 75, 4718 – 4723, (2003)
- [39] N.J. Petersen, R.P.H. Nikolajsen, K.B. Mogensen, J.P. Kutter, Effect of joule heating on efficiency and performance for microchip-based and capillary-based electrophoretic separation systems: A closer look, *Electrophoresis* 25, 253 – 269, (2004)
- [40] D. Erickson, D. Sinton, D.Q. Li, Joule heating and heat transfer in poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems *Lab Chip* 3, 141 – 149, (2003)
- [41] X.C. Xuan, D.Q. Li, Analytical study of Joule heating effects on electrokinetic transportation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1064, 227 – 237, (2005)
- [42] G.Y. Tang, D.G. Yan, C. Yang, H.Q. Gong, J.C. Chai, Y.C. Lam, Assessment of Joule heating and its effects on electroosmotic flow and eletrophoretic transport of solutes in microfluidic channels, *Electrophoresis* 27, 628 – 639, (2006)
- [43] G.Y. Tang, D.G. Yan, C. Yang, H.Q. Gong, C.K. Chai, Y.C. Lam, Joule heating and its effects on electrokinetic transport of solutes in rectangular microchannels, *Sens. Actuators, A* 139, 221 – 232, (2007)
- [44] Y. Wang, Q. Lin, T. Mukherjee, A Model for Joule Heating-Induced Dispersion in Microchip Electrophoresis, *Lab on Chip* 4, 625 – 631, (2004)
- [45] A. Karczemska, Sekwencjoner DND nowej generacji – dobór materiału, *Disertační práce*, Politechnika Warszawska, Warszawa, (2002)
- [46] Z.H. Fan, D.J. Harrison, Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections *Analytical Chemistry*, Vol 66, Issue 1, 177 – 184, (1994)
- [47] F.S. Collins, The human genome project and the future of medicine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 882, 42 – 55, (1999)
- [48] F.S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walters, New goals for the US human genome project: 1998–2003. *Science* 282, 682 – 689, (1998)
- [49] P. Liu, J. R. Scherer, S. A. Greenspoon, T. N. Chiesl, R. A. Mathies: Integrated sample cleanup and capillary array electrophoresis microchip for forensic short tandem repeat analysis, *Forensic Science International: Genetics* 5, 484–492, (2011)
- [50] S. Liu, Y. Shi, W.W. Ja, R.A. Mathies, Optimization of high-speed DNA sequencing on microfabricated capillary electrophoresis channels. *Anal. Chem.* 71, 566–573, (1999)



- [51] S. Liu, H. Ren, Q. Gao, D.J. Roach, R.T. Loder, T.M. Armstrong, Q. Mao, T. Blaga, D.L. Barker, S.B. Jovanovich, Automated parallel DNA sequencing on multiple channel microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 5369–5374, (2000)
- [52] S. Yatsushiro, Y. Yamaguchi, S. Yamamura, Y. Shinohara, Y. Baba, M. Kataoka, Highly sensitive DNA detection with a combination of 2 DNA-intercalating dyes for microchip electrophoresis; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 202–205, (2011)
- [53] F.S. Collins, The human genome project and the future of medicine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 882, 42–55, (1999)
- [54] P.C. Simpson, D. Roach, A.T. Woolley, T. Thorsen, R. Johnston, G.F. Sensabaugh, R.A. Mathies, High-throughput genetic analysis using microfabricated 96-sample capillary array electrophoresis microplates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2256 – 2261, (1998)
- [55] Y. Shi, P.C. Simpson, J.R. Scherer, D. Wexler, C. Skibola, M.T. Smith, R.A. Mathies, Radial capillary array electrophoresis microplate and scanner for high-performance analysis. *Anal. Chem.* 71, 5354 – 5361, (1999)
- [56] N.J. Munro, K. Snow, J.A. Kant, J.P. Landers, Molecular diagnostics on microfabricated electrophoretic devices: from slab gel to capillary to microchip based assays for T- and B-cell lymphoproliferative disorders. *Clin. Chem.* 45, 1906 – 1917, (1999)
- [57] I. Rech, S. Marangoni, A. Gulinatti, M. Ghioni, S. Cova. Portable genotyping system: Four-colour microchip electrophoresis, *Sensors and Actuators B* 143, 583 – 589, (2010)
- [58] L.B. Koutny, D. Schmalzing, T.A. Taylor, M. Fuchs, Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Anal. Chem.* 68, 18 – 22, (1996)
- [59] D. Schmalzing, L.B. Koutny, T.A. Taylor, W. Nashabeh, M. Fuchs, Immunoassay for thyroxine (T4) in serum using capillary electrophoresis and micromachined devices. *J. Chromatogr. B* 697, 175 – 180, (1997)
- [60] N.H. Chiem, D.J. Harrison, Microchip systems for immunoassay: an integrated immunoreactor with electrophoretic separation for serum theophylline determination. *Clin. Chem.* 44, 591 – 598, (1998)
- [61] Y. Jang, S. Y. Oh, J. K Park, In situ electrochemical enzyme immunoassay on a microchip with surface-functionalized poly(dimethylsiloxane) channel *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1122 – 1127, (2006)
- [62] Y. Huang, S. Zhao, M. Shi, Y. M. Liu: Chemiluminescent immunoassay of thyroxine enhanced by microchip electrophoresis, *Analytical Biochemistry* 399, 72 – 77, (2010)
- [63] A. Pandey, M. Mann, Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837 – 846, (2000)
- [64] H. Liu, C. Felten, Q. Xue, B. Zhang, P. Jedrzejewski, B. Karger, F. Foret, Development of multichannel devices with an array of electrospray tips for high-throughput mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 3303 – 3310, (2000)
- [65] C. Wang, R. Oleschuk, F. Ouchen, J. Li, P. Thibault, D.J. Harrison, Integration of immobilized trypsin bead beds for protein digestion within a microfluidic chip

- incorporating capillary electrophoresis separations and an electrospray mass spectrometry interface. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 14, 1377 – 1383, (2000)
- [66] R.D. Rocklin, R.S. Ramsey, J.M. Ramsey, A microfabricated fluidic device for performing two-dimensional liquid phase separations. *Anal. Chem.* 72, 5244 – 5249, (2000)
- [67] M.H. Ghanim, M.Z. Abdullah, Integrating amperometric detection with electrophoresis microchip devices for biochemical assays: Recent developments, *Talanta* 85, 28 – 34, (2011)
- [68] A.T. Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection, *Anal. Chem.* 70, 684 – 688, (1998)
- [69] Y.H. Chen, S.H. Chen, Analysis of DNA fragments by microchip electrophoresis fabricated on poly(methyl methacrylate) substrates using a wire-imprinting method, *Electrophoresis* 21, 165–170, (2000)
- [70] H. Nakanishi, T. Nishimoto, A. Arai, H. Abe, M. Kanai, Y. Fujiyama, Y. Yoshida, Fabrication of quartz microchips with optical slit and development of a linear imaging UV detector for microchip electrophoresis systems, *Electrophoresis* 22, 230 – 234, (2001)
- [71] M. Castano-Alvarez, A. Fernandez-la-Vilia, D.F. Pozo-Ayuso, M.T. Fernandez-Abedul, A. Costa-Garcia, Multiple-point electrochemical detection for a dual-channel hybrid poly(dimethylsiloxane)-glass microchip electrophoresis device, *Electrophoresis* 30, 3372 – 3380, (2009)
- [72] R. Liang, P. Hu, G. Gan, J. Qiu, Deoxyribonucleic acid modified poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels for the enhancement of microchip electrophoresis *Talanta* 77, 1647 – 1653, (2009)
- [73] W. Cao, M. Su, S. Zhang, Rapid and sensitive DNA target detection using enzyme amplified electrochemical detection based on microchip *Electrophoresis* 31, 659 – 665, (2010)
- [74] N. Godino, D. Snakenborg, J.P. Kutter, J. Emneus, M.F. Hansen, F.X. Munoz, F.J. del Campo, Construction and characterisation of a modular microfluidic system: Coupling magnetic capture and electrochemical detection, *Microfluid. Nanofluid.* 8, 393 – 402, (2010)
- [75] S.R. Nugen, P.J. Asciello, J.T. Connelly, A.J. Baeumner, PMMA biosensor for nucleic acids with integrated mixer and electrochemical detection *Biosens. Bioelectron.* 24, 2428 – 2433, (2009)
- [76] J.M. Li, C. Liu, J.S. Liu, Z. Xu, L.D. Wang, Multi-layer PMMA microfluidic chips with channel networks for liquid sample operation *J. Mater. Process Tech.* 209, 5487 – 5493, (2009)
- [77] Z. Hao, H. Chen, X. Zhu, J. Li, C. Liu, Modification of amorphous poly(ethylene terephthalate) surface by UV light and plasma for fabrication of an electrophoresis chip with an integrated gold microelectrode *J. Chromatogr. A* 1209, 246 – 252, (2008)
- [78] H. Yu, F.-Y. He, Y. Lu, Y.-L. Hu, H.-Y. Zhong, X.-H. Xia, Improved separation efficiency of neurotransmitters on a native printed capillary electrophoresis microchip simply by manipulating electroosmotic flow, *Talanta* 75, 43 – 48, (2008)



- [79] A.L. Liu, F.Y. He, Y.L. Hu, X.H. Xia, Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis, *Talanta* 68, 1303 – 1308, (2006)
- [80] Y. Wang, Q. He, Y. Dong, H. Chen, In-channel modification of biosensor electrodes integrated on a polycarbonate microfluidic chip for micro flow-injection amperometric determination of glucose, *Sens. Actuator B-Chem.* 145, 553 – 560, (2010)
- [81] N. Godino, D. Snakenborg, J.P. Kutter, J. Emneus, M.F. Hansen, F.X. Munoz, F.J. del Campo, Construction and characterisation of a modular microfluidic system: Coupling magnetic capture and electrochemical detection, *Microfluid. Nanofluid.* 8, 393 – 402, (2010)
- [82] M. Castano-Alvarez, M. Fernandez-Abedul, A. Costa-Garcia, Electroactive intercalators for DNA analysis on microchip electrophoresis, *Electrophoresis* 28, 4679 – 4689, (2007)
- [83] S.K. Kailasa, S.H. Kang, Microchip-based capillary electrophoresis for DNA analysis in modern biotechnology: A review *Sep. Purif. Rev.* 38, 242 – 288, (2009)
- [84] M. Castano-Alvarez, M.T. Fernandez-Abedul, A. Costa-Garcia, M. Agirregabiria, L.J. Fernandez, J.M. Ruano-Lopez, B. Barredo-Presa, Fabrication of SU-8 based microchip electrophoresis with integrated electrochemical detection for neurotransmitters *Talanta* 80, 24 – 30, (2009)
- [85] N. Godino, D. Snakenborg, J.P. Kutter, J. Emneus, M.F. Hansen, F.X. Munoz, F.J. del Campo, Construction and characterisation of a modular microfluidic system: Coupling magnetic capture and electrochemical detection, *Microfluid. Nanofluid.* 8, 393 – 402, (2010)
- [86] N.S. Tambe, B. Bhushan, Micro/nanotribological characterization of PDMS and PMMA used for BioMEMS/NEMS applications *Ultramicroscopy* 105, 238 – 247, (2005)
- [87] J.J. Xu, A.J. Wang, H.Y. Chen, Electrochemical detection modes for microchip capillary electrophoresis, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 2, (2007)
- [88] I. Wong, C.M. Ho, Surface molecular property modifications for poly (dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices *Microfluid. Nanofluid.* 7, 291–306, (2009)
- [89] D.R. Tokachichu, B. Bhushan, Bioadhesion of polymers for BioMEMS, *IEEE Trans. Nanotech.* 5, 228 – 231, (2006)
- [90] A.L. Liu, F.Y. He, Y.L. Hu, X.H. Xia, Plastified poly(ethylene terephthalate) (PET)-toner microfluidic chip by direct-printing integrated with electrochemical detection for pharmaceutical analysis, *Talanta* 68, 1303 – 1308, (2006)
- [91] H. Becker, L. E. Locascio, Polymer microfluidic devices, *Talanta* 56, 267 – 287, (2002)
- [92] Y. Fintschenko, A. van den Berg, Silicon microtechnology and microstructures in separation science *J. Chromatogr. A* 819, 3 – 12, (1998)
- [93] B.A. Grzybowski, R. Haag, N. Bowden, G.M. Whitesides, Generation of micrometer-sized patterns for microanalytical applications using a laser direct-write method and microcontact printing, *Anal. Chem.* 70, 4645 – 4652, (1998)



- [94] W.C. Tian, E. Finehout, *Microfluidics for Biological Applications*, ISBN: 978-0-387-09479-3, Springer (2008)
- [95] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *Anal. Chem.* 70, 4974 – 4984, (1998)
- [96] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A. Schueller, G.M., Whitesides, Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis* 21, 27 – 40, (2000)
- [97] H. Becker, C. Gartner, Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis* 21, 12 – 26, (2000)
- [98] M. Ueda, H. Nakanishi, O. Tabata, Y. Baba, Imaging of a band for DNA fragment migrating in microchannel on integrated micro chip, *Materials Science and Engineering C* 12, 33 – 36, (2000)
- [99] Y. Sun, Y. C. Kwok, N. T. Nguyen, Low-pressure, high-temperature thermal bonding of polymeric microfluidic devices and their applications for electrophoretic separation, *J. Micromech. Microeng.* 16, 1681 – 1688, (2006)
- [100] H. Bjorkman, P. Rangsten, P. Hollman, K. Hjort, Diamond replicas from microstructured silicon masters, *Sensors and Actuators* 73, 24 – 29, (1999)
- [101] M. Adamschik, M. Hinz, C. Maier, P. Schmid, H. Seliger, E.P. Hofer, E. Kohn, Diamond micro system for bio-chemistry, *Diamond and Related Materials* 10, 722 – 730, (2001)
- [102] A.V. Karabutov, V.G. Ralchenko, I.I. Vlasov, R.A. Khmelnsky, M.A. Negodaev, V.P. Varnin, I.G. Teremetskaya, Surface engineering of diamond tips for improved field electron emission, *Diamond and Related Materials* 10, 2178 – 2183, (2001)
- [103] S. Queste, R. Salut, S. Clatot, J.-Y. Rauch, Chantal G. Khan Malek, Manufacture of microfluidic glass chips by deep plasma etching, femtosecond laser ablation, and anodic bonding, *Microsyst Technol* 16, 1485 – 1493, (2010)
- [104] P. Niedzielski, *Wytwarzanie i zastosowanie proszków diamentowych*, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź (2011)
- [105] M. Fijałkowski, A. Karczemska, J. Łysko, P. Louda, V. Ralchenko, S. Mitura, Diamentowy mikrochip elektroforetyczny, *Elektronika – konstrukcje, technologie, zastosowania* vol. 9, (2009)
- [106] A. Karczemska, V. Ralchenko, A. Bolshakov, D. Sovyk, J. M. Lysko, M. Fijałkowski, J. Hassard Implantexpert, Zabrze, (2011)
- [107] A.M. Pizzo Passaro, M.C. Salvadori U D.R. Martins, M. Cattani, Fidelity of diamond replicas on silicon substrate, *Thin Solid Films* vol. 377 – 378, 285 – 289, (2000)
- [108] S. Gritsinin, A. Kossyi, N. Malykh, V. G. Ralchenko, K. F. Sergeichev, V. P. Silakov, A. Sychev, N. M. Tarasova and A. V. Chebotarev, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 31, 2940, (1998)
- [109] R. Szczypiński, J. Grzelka, A. Baraniecka, M. Górską, J. Lesiński, J. Łysko, R. Grodecki, D. G. Pijanowska, P. Grabiec, Microfluidic preconcentrator and microfluidic chip for bacterial cells detection, *Optica Applicata*, Vol. XLI, No. 2, (2011)
- [110] M. A Eddings, M. A Johnson, B. K. Gale, Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices, *J. Micromech. Microeng.* 18 (2008)



- [111] R. Szczypiński, D. G. Pijanowska, Technologia i zastosowanie poli(dimetylosiloksanu) – PDMS w mikroukładach analitycznych, *Elektronika: konstrukcje, technologie, zastosowania*, vol. 49, nr 11, s. 249 – 253, (2008)
- [112] P. Kula, *Inżynieria Warstwy Wierzchniej*, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź (2000)
- [113] D.B. Hovis, A.H. Heuer, The use of laser Canning confocal microscopy (LSCM) in material science, *Journal of Microscopy*, vol 240, 173 – 180, (2010)
- [114] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. A reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data*, Published by ULVAC-PHI, Inc. Japan (1992)
- [115] E. T. Dutkiewicz, *Fizykochemia Powierzchni*. WNT Warszawa 1982
- [116] M. Zenkiewicz, *Adhezja i modyfikowanie warstwy wierzchniej tworzyw wielkocząsteczkowych*. WNT Warszawa (2000)
- [117] X. Li, B. Bhushan, A review of nanoindentation continuous stiffness measurement technique and its applications, *Materials Characterization* 48, 11 – 38 (2002)
- [118] G. Cao, *Nanostructures & Nanomaterials. Synthesis, Properties & Application*, Imperial College Press, (2004)
- [119] W.J. Parker, R.J. Jenkins, C.P. Butler, and G.L. Abbott, A flash method of determining thermal diffusivity, heat capacity and thermal conductivity, *J. Appl. Phys.*, 32, 1679, (1961)
- [120] S. Min, J. Blumm, and A. Lidemann, A new laser flash system for measurement of the thermophysical properties, *Thermochemica Acta*, 455, 46 (2007)
- [121] A. Cygański, *Metody Spektroskopowe w Chemii Analitycznej*, WNT (2010)
- [122] W. A. Minkina *Technika pomiarów w podczerwieni w procesach technologicznych*. Wyd. Politechnika Częstochowska, Instytut Elektroniki i Systemów Sterowania, Częstochowa (2000)
- [123] B. Wiecek, G. De Mey, *Termowizja w podczerwieni podstawy i zastosowania*, Wydawnictwo Pomiar Automatyka Kontrola (2010)
- [124] M. Castano-Alvarez, M. T. Fernandez-Abedul, A. Costa-Garcia, Amperometric detector designs for capillary electrophoresis microchips, *Journal of Chromatography A*, vol. 1109, 291 – 299 (2006)
- [125] S.N. Ding, J.J. Xu, H.Y. Chen, Microchip capillary electrophoresis coupled with an end-column electrochemiluminescence detection, *Talanta* 70, 403 – 407, (2006)
- [126] A. R. Stettler, M. A. Schwarz, Affinity capillary electrophoresis on microchips, *Journal of Chromatography A*, 1063, 217 – 225, (2005)
- [127] F. Lacharme, M. A. M. Gijs, Pressure injection in continuous sample flow electrophoresis microchips, *Sensors and Actuators B* 117, 384 – 390, (2006)
- [128] B. Humbert, N. Hellala, J. J. Ehrhardt, S. Barrat, E. Bauer-Grosse, X-ray photoelectron and Raman studies of microwave Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition (PACVD) diamond films, *Applied Surface Science* 254, 6400 – 6409, (2008)
- [129] J.I.B. Wilson, J.S. Walton, G. Beamson, Analysis of chemical vapour deposited diamond films by X-ray photoelectron spectroscopy, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 121, 183 – 201, (2001)



- [130] Y. Taki, O. Takai, XPS structural characterization of hydrogenated amorphous carbon thin films prepared by shielded arc ion plating, *Thin Solid Films* 316, 45 – 50, (1998)
- [131] S. Dieckhoff, D. Ochs, J. Gunster, V. Kempter, Metastable impact electron spectroscopy (MIES) study of chemical vapour deposited (CVD) diamond films, *Surface Science* 423, 53 – 60, (1999)
- [132] M. Filippi, L. Calliari, Measuring the energy of the graphite $\pi + \sigma$ plasmon peak, *Surf. Interface Anal* 38, 595 – 598, (2006)
- [133] W. Desorbo, Specific Heat of Diamond at Low Temperatures, *J. Chem. Phys.* 21, 876, (1953)
- [134] A. Chojnacki, Kontrola temperatury w czasie elektroforezy za pomocą modułu Peltiera, *Diplomová práce* (školitel: Anna Karczewska, konzultant: Mateusz Fijałkowski), Łódź (2010)
- [135] K. Chrzanowski, Z. Jankiewicz, Model błędów metody pomiaru temperatury za pomocą kamer termowizyjnych, *Metrologia i Systemy Pomiarowe*, Warszawa Nr 1 – 2 , 53 – 624 (1997)
- [136] L. Bousse, C. Cohen, T. Nikiforov, A. Chow, A. R. Kopf-Sill, R. Dubrow, J. W. Parce, Electrokinetically controlled microfluidic analysis systems, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* vol. 29, 155 – 181 (2000)
- [137] S.E. Coe, R.S. Sussmann, Optical, thermal and mechanical properties of CVD diamond, *Diamond and Related Materials* 9, 1726 – 1729, (2000)
- [138] S. Chowdhury, E. de Barra, M.T. Laugier, Study of mechanical properties of CVD diamond on SiC substrates, *Diamond & Related Materials* 13, 1625 – 1631, (2004)
- [139] J.W. Ager III, D.K. Veirs, G.M. Rosenblatt, Spatially resolved Raman studies of diamond films grown by chemical vapor deposition, *Phys. Rev. B* 43, 6491 – 6499, (1991)
- [140] S. Praver, R. J. Nemanich, Raman spectroscopy of diamond and doped diamond, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 362, 2537 – 2565 (2004)
- [141] E. Woerner, C. Wild, W. Mueller-Sebert, R. Lecher, P. Koidl, Thermal conductivity of CVD diamond films: high-precision, temperature-resolved measurements, *Diamond and Related Materials* 5, 688 – 692, (1996)
- [142] Y. Mokuno, A. Chayahara, H. Yamada, N. Tsubouchi, Improving purity and size of single-crystal diamond plates produced by high-rate CVD growth and lift-off process using ion implantation, *Diamond & Related Materials* 18, 1258 – 1261, (2009)
- [143] J. Robertson, Plasma Deposition of Diamond-Like Carbon, *Japanese Journal of Applied Physics* 50, (2011)
- [144] A. A. Altukhov, A. M. Klochkova, A. Yu. Mityagin, G. A. Orlova, V. I. Polyakov, N. Kh. Talipov, and V. S. Feshchenko *Journal of Communications Technology and Electronics*, vol. 52, No. 3, 360 – 363, (2007)
- [145] D. Wu, J. Qin, B. Lin, Electrophoretic separations on microfluidic chips, *Journal of Chromatography A* 1184, 542 – 549, (2008)

9. Seznam obrázků a tabulek

Seznam obrázků:

Obr. 1	Schéma geometrie elektroforetického mikročipu, S – zásobník se vzorkem, SW – zásobník odpadů vzorku, B – zásobník pufu, BW – zásobník odpadů pufu, D – bod detekce	str.11
Obr. 2	Schéma mikročipu s jednotlivými kanály. Ve zvětšení jsou zobrazeny systémy zavedení zkoumaných vzorků ve tvaru T – injektoru a dvojitého T – injektoru	str.13
Obr. 3	Křemenný mikročip pro separaci bílkovin, (A) Schéma zavedení vzorku a jednotlivé postupy separace, SR – zásobník ze vzorkem, SW – zásobník odpadů vzorku, BW – zásobník s pufrem, SW – zásobník odpadů pufu (B) Fluorescenční snímky z jednotlivých fází zavedení vzorku	str.15
Obr. 4	Způsob vyplňování mikrokanálu: a) zavedení vzorku do hlavního kanálu, b) dávkování vzorku	str.16
Obr. 5	Použití elektrického pole k eliminaci jevu disperse v průběhu elektroforézy: a) profil průtoku bez použití ventilu, b) profil průtoku s použitím ventilu c) schéma umístění mikroelektrod v mikročipu	str.16
Obr. 6	Elektroforetický mikročip a) schéma kanálů na skleněném substrátu, b) obraz ukazující spojení 4 kanálů o šířce 30 μm	str.17
Obr. 7	Elektroforetický mikročip se serpentínovou geometrií hlavního kanálu, S – vzorek, B – puf, SW – zásobník odpadu vzorku, BW – zásobník odpadů pufu	str.18
Obr. 8	Geometrie mikrokanálů pro mikročipovou elektroforézu s detekcí pomocí hmotnosti spektrometrie, MS – hmotnostní spektrometr, S – vzorek, B – puf, SW – zásobník odpadů vzorku, SL – tekutina podporující ionizaci, W – tekutina pro propláchnutí	str.18
Obr. 9	SEM snímky příčných řezů mikrokanálů: a), b) kanál o oválném tvaru vyrobený ze sodno-vápeného skla, c) kanál o lichoběžníkovém tvaru vyrobený z polykrytalického diamantu	str.20
Obr. 10	Elektroforetická separace DNA: a) elektroforegram získaný při zkoumání provedeném současně v 16 kanálech, b) čtyřbarevná analýza sekvencování DNA	str.26
Obr. 11	Schéma 96 kanálového elektroforetického mikročipu pro genetické analýzy. Geometrické rozměry: šířka odpadních kanálů 300 μm , separační kanál 85 μm , katodový kanál 200 μm	str.28
Obr. 12	a) Elektroforetický mikročip pro genetické analýzy skládající se z 96 kanálů. Separační kanál 200 μm ve tvaru T - injekce, šířka kanálu 110 μm , hloubka 50 μm a průměr nádrží 1,2 mm. Separační kanál ve vzdálenosti 33 mm od detektoru, průměr mikročipu 100 mm b) Electroforegram z 96 kanálů pro MTHFR genotyp získaný v čase kratším než 100 s. Byly použity dva typy fluorescenčních markérů pro označení a detekce	str.29
Obr. 13	Diagnóza přeskupení genů lymfomu (latina lymfomu) pomocí kapilární elektroforézy (A) a mikročipu(B)	str.30
Obr. 14	Mikročip s integrovanými kanály imunoreaktoru. Úsek J1 - J3 byl použit k míchání s antigenem a značkovací látkou. Úsek J3 - J4 byl použit k míchání (Th) s antigenem a značkovací látkou. Ve zvětšení je uveden systém dvojité T - injekce	str.31
Obr. 15	Uspořádání a rozměry mikročipu z materiálu sklo - PDMS. S - zásobník vzorků, B – zásobník pufu, SW – zásobník odpadů vzorku BW – zásobník odpadů pufu R – zásobník oxidantu roztoku	str.32
Obr. 16	Schéma integrovaného elektroforetického mikročipu s podkladem vyplňujícím mikrokanály. Pohled shora a boční ukazuje hustotu podkladu trypsinu. Ostatní rozměry jsou: šířka kanálu 230 μm u zásobníků, šířka hlavního kanálu 30 μm . Hloubka kanálu je 10 mm po celé délce	str.34
Obr. 17	Schéma mikročipu používajícího dvourozměrnou techniku: a) struktura mikročipu, b) schéma provedení zkoumání, S - zkoumaný vzorek, B – puf, W - odpad	str.35
Obr. 18	Elektroforegram komplexu SDS – bílkovina. Rozsah napětí od 350 V do 1200 V	str.35
Obr. 19	Použití různých materiálů v mikročipové elektroforéze	str.36
Obr. 20	Technologie výroby mikročipů: a) pro skleněný čip [4], b) pro čip vyrobený z PDMS	str.39
Obr. 21	SEM snímek průřezu mikrokanálu vyrobeného z PMMA technikou laserové ablace, šířka kanálu 150 – 400 μm , hloubka od 50 do 1500 μm	str.40
Obr. 22	Schéma ukazující proces výroby diamantové mikrostruktury s použitím metody repliky	str.41
Obr. 23	Schéma ukazující etapy dvoustupňového procesu repliky	str.41
Obr. 24	SEM snímky příkladu diamantových mikrostruktur získaných pomocí jedno a dvoustupňové techniky repliky	str.42
Obr. 25	Skleněná mikrostruktura vyrobená technikou ICP – RIE o hloubce 80 μm , a) snímek struktury, b) SEM snímek jednotlivé stěny o šířce 2 μm	str.43
Obr. 26	Části modelů 3D zařízení: a) Diamantová mikrostruktura b) Vyplň mikrokanálů (puf)	str.47



	<i>KCL) c) Diamantový kryt</i>	
Obr. 27	<i>Diskretizace tvaru mikrokanálů vyplněných pufrem KCL</i>	<i>str.47</i>
Obr. 28	<i>Ukázkové výsledky počítačových simulací: a) distribuce teploty ve struktuře ze skla b) distribuce teploty ve struktuře z diamantu c) distribuce teploty v průřezu skleněného mikročipu d) distribuce teploty v průřezu diamantového mikročipu e) distribuce tepelného toku podél mikrokanálů</i>	<i>str.48</i>
Obr. 29	<i>Porovnávací rozložení teploty pro mikrokanály ze skla a diamantu</i>	<i>str.49</i>
Obr. 30	<i>Projekt vytvoření masky k fotolitografii</i>	<i>str.50</i>
Obr. 31	<i>Struktura s označenými místy zvětšených detailů</i>	<i>str.51</i>
Obr. 32	<i>Zvětšení fragmentů počítačového návrhu struktury zobrazující hlavní detaily sítě mikrokanálů, rozměry uvedeny v [μm]</i>	<i>str.52</i>
Obr. 33	<i>Technologie vytvoření křemíkové matrice</i>	<i>str.52</i>
Obr. 34	<i>Schéma sekvence vytvoření křemíkové struktury</i>	<i>str.54</i>
Obr. 35	<i>Získané geometrie masky: a) celkový pohled na strukturu b) jednotlivé mikrokanály</i>	<i>str.54</i>
Obr. 36	<i>Snímek SEM zkušební struktury</i>	<i>str.54</i>
Obr. 37	<i>Schéma reaktoru k osazování vrstev polykrystalického diamantu MP CVD [108]</i>	<i>str.55</i>
Obr. 38	<i>Náhled přístroje MP CVD model DF – 100 použitého k vytvoření polykrystalického diamantu</i>	<i>str.56</i>
Obr. 39	<i>Vytvořená diamantová mikrostruktura</i>	<i>str.56</i>
Obr. 40	<i>Schématické zobrazení spojení mikrostruktury s krytem</i>	<i>str.57</i>
Obr. 41	<i>Diamantová mikrostruktura uzavřená krytem s připojenými mikroporty</i>	<i>str.58</i>
Obr. 42	<i>Vyznačení úhlu smáčení z geometrie kapky [115]</i>	<i>str.63</i>
Obr. 43	<i>Graf zatěžující síly ve funkci proniknutí indentoru</i>	<i>str.65</i>
Obr. 44	<i>Schéma typického uspořádání zařízení pro měření tepelné vodivosti ve směru kolmém na povrch</i>	<i>str.67</i>
Obr. 45	<i>Schéma sestaveného zařízení</i>	<i>str.71</i>
Obr. 46	<i>Celkový náhled na testovací soustavu</i>	<i>str.72</i>
Obr. 47	<i>Měřicí hlava zkušební soustavy</i>	<i>str.72</i>
Obr. 48	<i>Vysokonapěťové elektrody: a) připojení ke zdroji pomocí adapteru, b) tvar platinové elektrody</i>	<i>str.73</i>
Obr. 49	<i>Vysokonapěťový zdroj</i>	<i>str.73</i>
Obr. 50	<i>Příkazy algoritmu</i>	<i>str.74</i>
Obr. 51	<i>Hlavní okno ovládání programu</i>	<i>str.75</i>
Obr. 52	<i>Schéma zařízení s označenými oblastmi pro SEM analýzu</i>	<i>str.76</i>
Obr. 53	<i>SEM snímky detailu A</i>	<i>str.76</i>
Obr. 54	<i>SEM snímky detailu B</i>	<i>str.77</i>
Obr. 55	<i>SEM snímky detailu C</i>	<i>str.77</i>
Obr. 56	<i>SEM snímky detailu D</i>	<i>str.77</i>
Obr. 57	<i>SEM snímky zkušební struktury detailu E</i>	<i>str.78</i>
Obr. 58	<i>SEM snímky polykrystalické strany vzrůstu diamantu</i>	<i>str.78</i>
Obr. 59	<i>Příčný řez mikrozásobníkem</i>	<i>str.79</i>
Obr. 60	<i>Příčný řez hlavním mikrokanálem</i>	<i>str.79</i>
Obr. 61	<i>Příčný řez spojovacím mikrokanálem</i>	<i>str.80</i>
Obr. 62	<i>Topografie povrchu diamantové mikrostruktury</i>	<i>str.81</i>
Obr. 63	<i>Profil drsnosti povrchu diamantové mikrostruktury</i>	<i>str.81</i>
Obr. 64	<i>Topografie povrchu dna diamantové mikrostruktury</i>	<i>str.81</i>
Obr. 65	<i>Profil drsnosti dna diamantové mikrostruktury</i>	<i>str.82</i>
Obr. 66	<i>XPS spektrum diamantového vzorku v rozsahu od 1000 do 0 eV</i>	<i>str.82</i>
Obr. 67	<i>XPS spektrum ve vysokém rozlišení pro uhlík</i>	<i>str.83</i>
Obr. 68	<i>XPS spektrum ve vysokém rozlišení pro dusík</i>	<i>str.84</i>
Obr. 69	<i>XPS spektrum ve vysokém rozlišení pro kyslík</i>	<i>str.84</i>
Obr. 70	<i>Spektroskopie charakteristických energetických ztrát elektronů</i>	<i>str.85</i>



Obr. 71	Bodová mikroanalýza EDX: a) spektrum, b) označené místo měření	str.85
Obr. 72	Liniová mikroanalýza EDX získaná napříč mikrokanálem	str.86
Obr. 73	Výsledek zkoumání EDX s označenými změnami chemického složení	str.86
Obr. 74	Profil kapky vody na zkoumaném povrchu: a) po výrobě, b) po 90 dnech, c) po 180 dnech	str.87
Obr. 75	Profil kapky diiodometanu na zkoumaném diamantovém povrchu: a) po výrobě, b) po 90 dnech, c) po 180 dnech	str.87
Obr. 76	Výsledky výpočtu volné povrchové energie zkoumaného vzorku	str.88
Obr. 77	Graf zobrazující změnu tvrdosti ve funkci proniknutí indentoru do vzorku	str.89
Obr. 78	Graf zobrazující změnu Youngova modulu ve funkci proniknutí indentoru do vzorku	str.89
Obr. 79	Příklad Ramanova spektra získaného v mikrokanálu; zvětšení ukazuje nepřítomnost jiných charakteristických píků od různých fází uhlíku	str.90
Obr. 80	Difraktogram diamantového vzorku s označenými rovinami a také jejich intenzitou ve srovnání s krystalografickou databází ICDD	str.91
Obr. 81	Schéma průběhu měření modifikované metody k měření tepelné difuzivity ve směru rovnoběžném s jeho povrchem	str.92
Obr. 82	Výstupní signál měřený In-Sb infračerveným detektorem a proložení křivkou pro adiabatický model	str.92
Obr. 83	Absorpční spektra diamantového mikročipu v oblasti UV-Vis: a) získané ve standardní transmisní konfiguraci, b) při použití integrační koule	str.93
Obr. 84	Příklad rozložení teploty na povrchu Peltierova článku (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)	str.95
Obr. 85	Průběh chlazení v závislosti na čase pro zvolenou teplotu 12°C	str.95
Obr. 86	Závislost změny teploty s funkcí hodnoty pH roztoku [134]	str.96
Obr. 87	Termogram ukazující rozložení teploty na povrchu mikročipu v průběhu chlazení na teplotu 8°C (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)	str.97
Obr. 88	Termogram zkoumané mikrostruktury s přivedeným napětím o hodnotě: a) 1000V; b) 2000V; c) 3000V; d) 4000V (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)	str.98
Obr. 89	Charakteristika teploty povrchu v závislosti na zvyšování napětí	str.98
Obr. 90	Termogramy zkoumané struktury při přivedeném napětí 4000 V: a) bez chlazení b) z chlazením na teplotu 10°C (zaznamenáno pomocí kamery VarioCam)	str.99
Obr. 91	Odvádění tepla z mikročipu	str.99
Obr. 92	Termogramy mikrokanálů s přivedeným napětím o hodnotě: a) 1 kV; b) 1,5 kV; c) 2 kV; d) 2,5 kV (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)	str.100
Obr. 93	Termogramy mikrokanálů s přiváděným napětím o hodnotě 2 kV se současným chlazením na teplotu: a) 5°C; a) 10°C; a) 15°C; a) 20°C (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)	str.101
Obr. 94	Termogramy: a) pro křemenné sklo (oblast 1) po korekci vlivu součinitele τ , b) pro křemenné sklo s PDMS těsněním (oblast 1) před korekcí vlivu součinitele τ , na pozadí scény absolutně černého těla (oblast 2) (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)	str.103
Obr. 95	Termogramy: a) měření na povrchu krytu bez korekce, b) měření s korekcí součinitele transmittance krytu (zaznamenáno pomocí kamery Titanium)	str.104

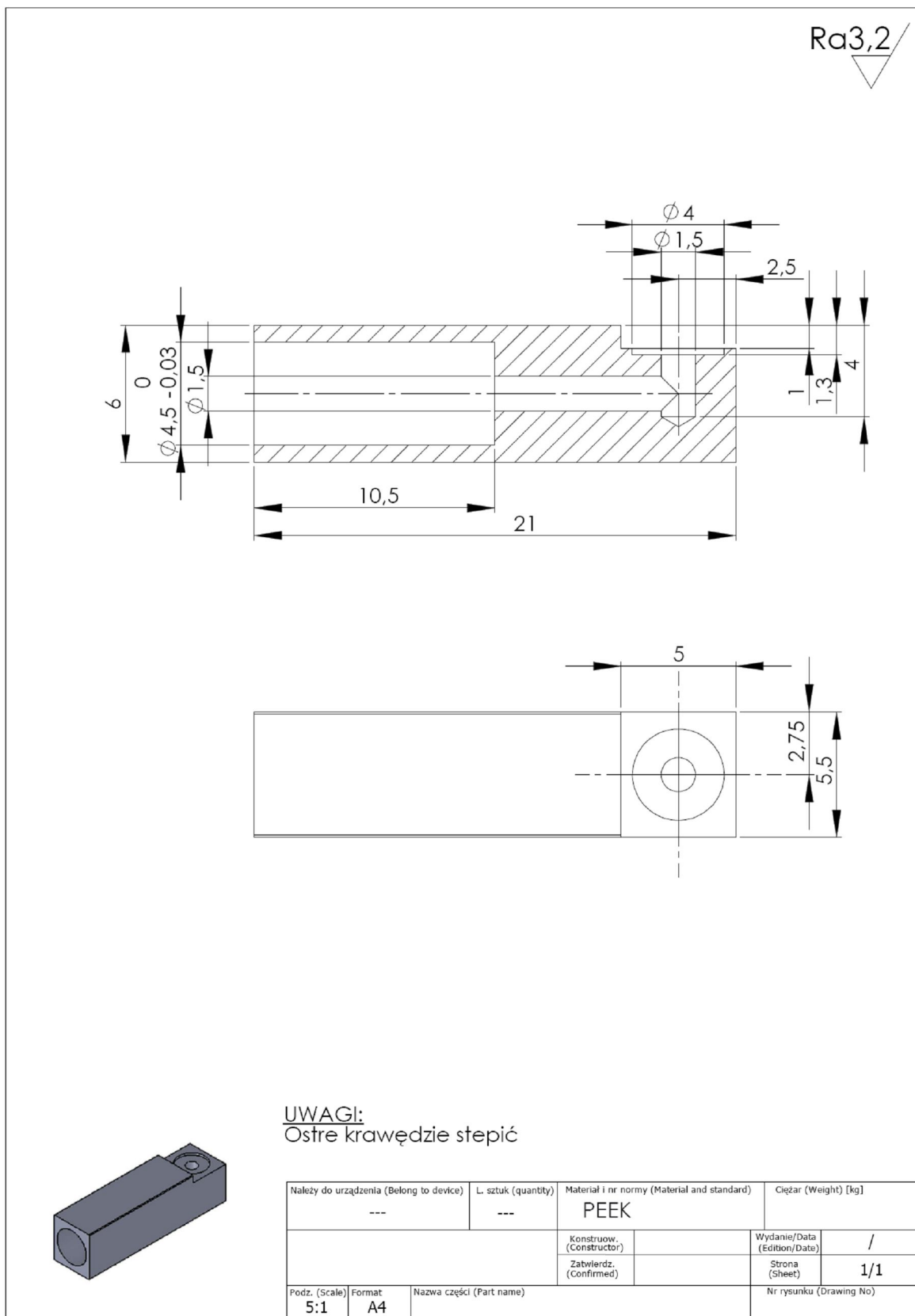
Seznam tabulek:

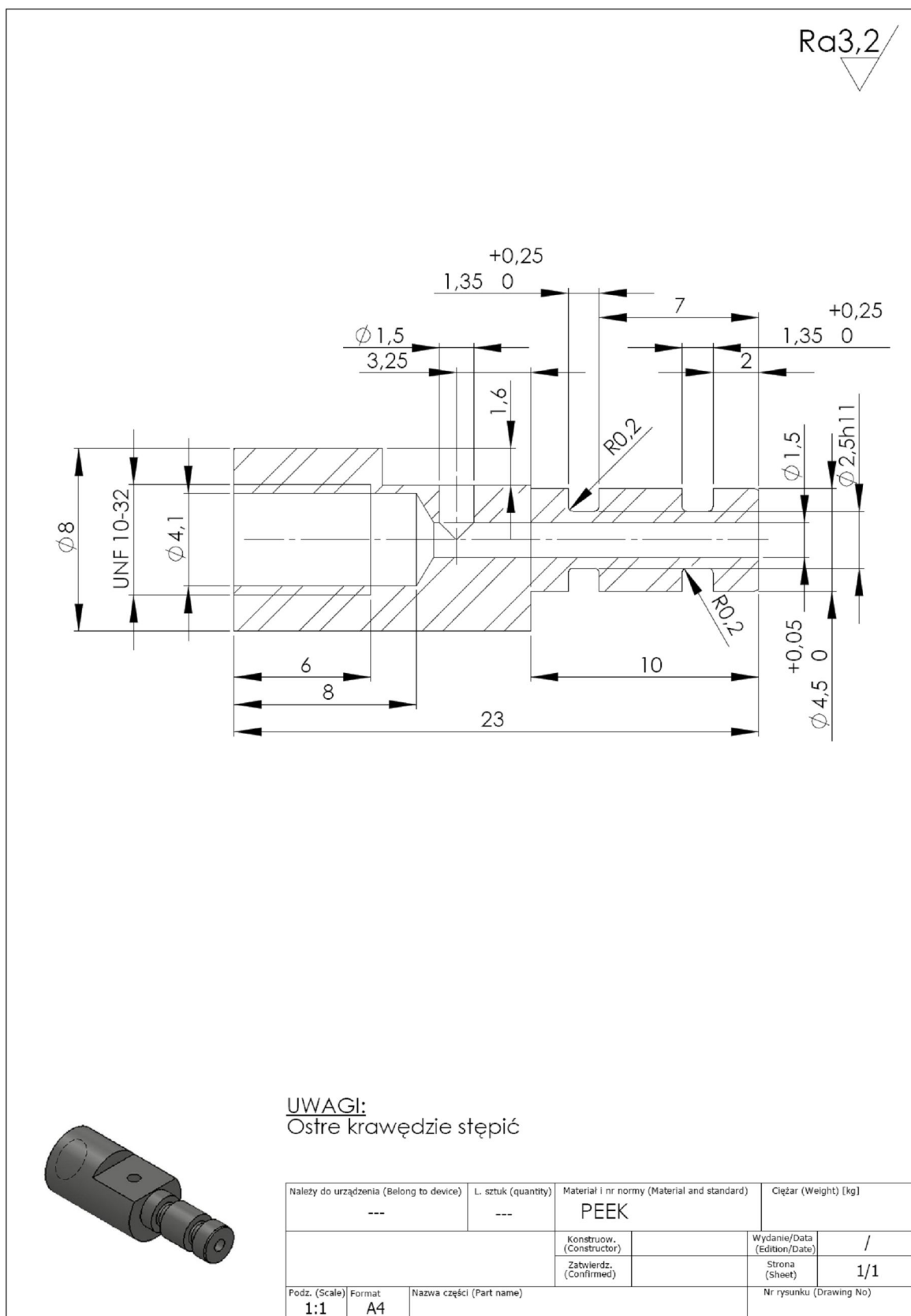
Tab. 1	Materiálové parametry diamantu a pufru z databáze daného programu	str. 46
Tab. 2	Hodnoty SEP a disperzní a polární složky testovacích tekutin	str.64
Tab. 3	Geometrické rozměry struktury získané pomocí CLSM metody	str.79
Tab. 4	Parametry drsnosti struktury	str.80
Tab. 5	Kvantitativní analýza chemického složení	str.83
Tab. 6	Hodnoty kontaktního úhlu vzorků měřené v pravidelných intervalech	str.87
Tab. 7	Hodnoty koeficientu emisivity zkoumaných materiálů	str.94
Tab. 8	Měření konduktance roztoků pufru	str.96
Tab. 9	Hodnota vzrůstu teploty ve funkci změny napětí	str.101
Tab. 10	Výsledky chlazení mikročipu	str.102
Tab. 11	Stanovení hodnoty součinitele transmittance měřením teplotních rozdílů	str.103



Příloha 1

Návrh portů







Příloha 2

Rentgenová difrakce XRD



PDF Card

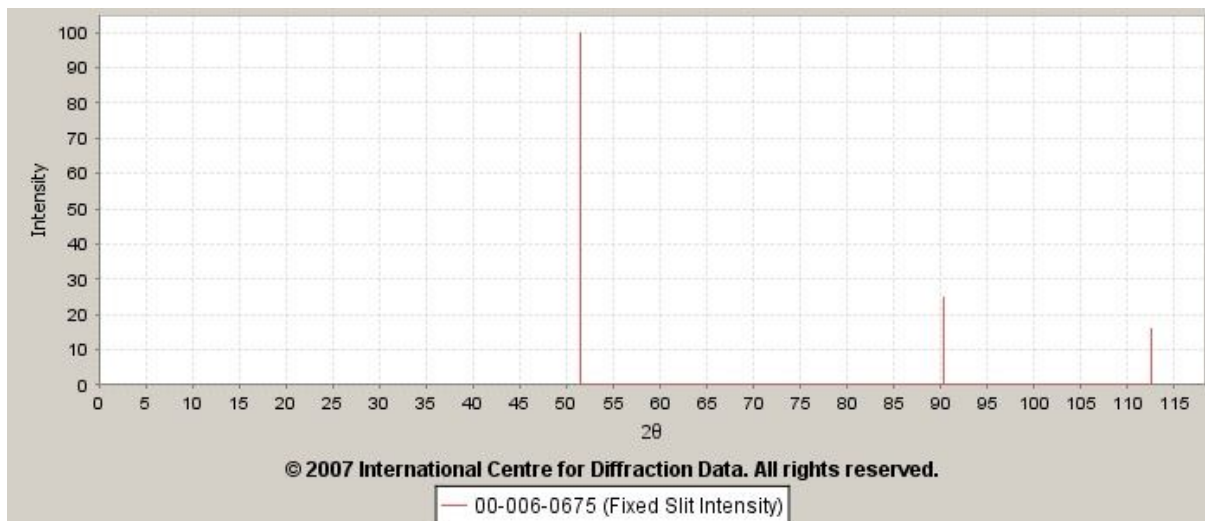
PDF Number	00-006-0675	Status	Primary	Quality Mark	Star (S)		
Pressure/Temperature	Ambient						
Chemical Formula	C						
Weight %	C100.00						
Atomic %	C100.00						
Compound Name	Carbon						
ANX							
Mineral Name	Diamond						
Also Called	carbonado, bort						
Experimental	Rad	λ	Filter	d-Spacing	Cutoff	Intensity	I/Ic
	CuK α 1	1.5405				Diffractionmeter	
	Camera Diameter	Reference					
		Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539 II, 5 (1953).					
Physical	SYS	Space Group	Aspect				
	Cubic	Fd-3m (227)					
	Author's Cell	a	b	c	α	β	γ
		3.5667					
		Volume					
	45.37						
	Reference	Ibid.					
	Dcalc	Dmeas	Dstruc	SS/FOM	Melting Point	Z	R-factor
	3.517	3.511		F(5) = 71.8 (0.0116, 6)		8.00	
	Error						
Crystal	Space Group	Z	Molecular Weight				
	Fd-3m (227)	8.00	12.01				
	Crystal Data	a	b	c	α	β	γ
		3.567	3.567	3.567	90.00	90.00	90.00
		Volume					
	45.37						
	Crystal Axial Ratio	a/b	c/b				
	Reduced Cell	a	b	c	α	β	γ
		2.522	2.522	2.522	60.00	60.00	60.00
Volume							
11.34							
Optical	$\varepsilon\alpha$	$n\omega\beta$	$\varepsilon\gamma$	Sign	2V		
		=2.4195					
	Reference	Ibid.					



Structure	TF Type	
	Origin	
	Atomic Coordinates	Atom Num Wyckoff Symmetry x y z SOF ITF AET
	SG Symmetry Operators	Seq Operator
	Anisotropic Temperature Factors	Atom Num ATF11 ATF22 ATF33 ATF12 ATF13 ATF23
	Crystal (Symmetry Allowed)	Centrosymmetric
Miscellaneous	CAS Number	7782-40-3
	Pearson	cF8.00
	Pearson w/o H	
	Subfile Indicator	Ceramic (Semiconductor), Common Phase, Educational Pattern, Forensic, Inorganic, Metals & Alloys, Mineral Related (Mineral ,gem), NBS Pattern, Primary Pattern
	Prototype Structure	C
	LPF Prototype Structure	
	Mineral Classification	Diamond (Supergroup), 2C-diamond (Group)
	Zeolite Classification	
	Entry Date	
	Last Modification Date	01/29/2007
	Former PDF #	
	Cross-Reference PDF #'s	00-001-1249 (Deleted), 01-075-0219 (Alternate), 01-075-0220 (Alternate), 01-075-0221 (Alternate), 01-075-0222 (Alternate), 01-075-0223 (Alternate), 01-075-0224 (Alternate), 01-075-0225 (Alternate), 01-075-0465 (Alternate), 01-075-0623 (Alternate), 01-075-0624 (Alternate), 01-079-1467 (Alternate), 04-005-7200 (Primary)
Comments	Database Comments	
	User Comments	
	Shared Comments	

**d-Spacings**

$$\lambda = 1.78897$$

**00-006-0675 (Fixed Slit Intensity)**

2θ	d(Å)	Intensity	h	k	l
51.4708	2.060000	100	1	1	1
90.3634	1.261000	25	2	2	0
112.5619	1.075400	16	3	1	1

© 2007 International Centre for Data Diffraction. All Rights Reserved

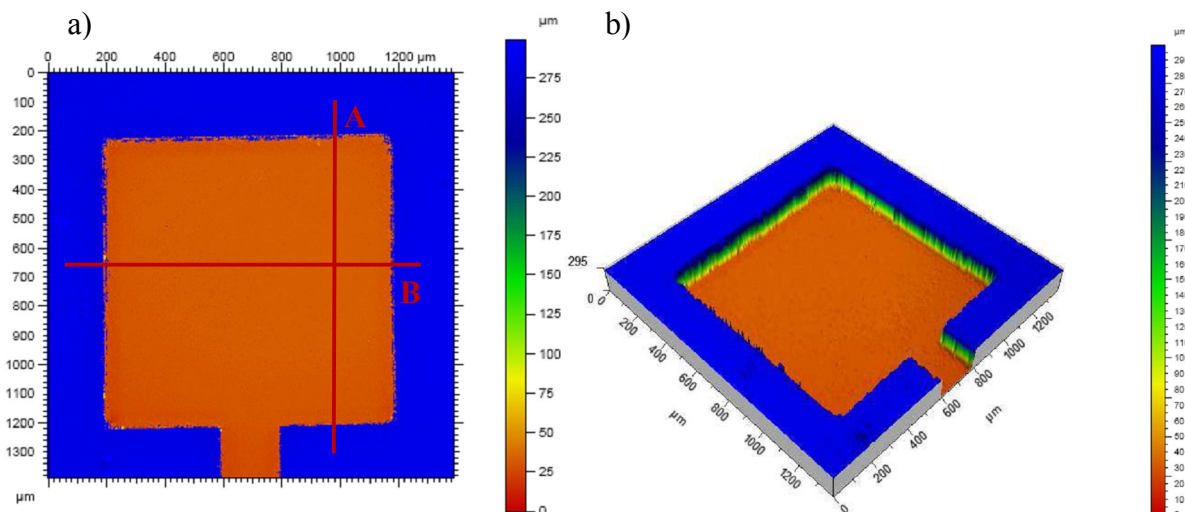


Příloha 3

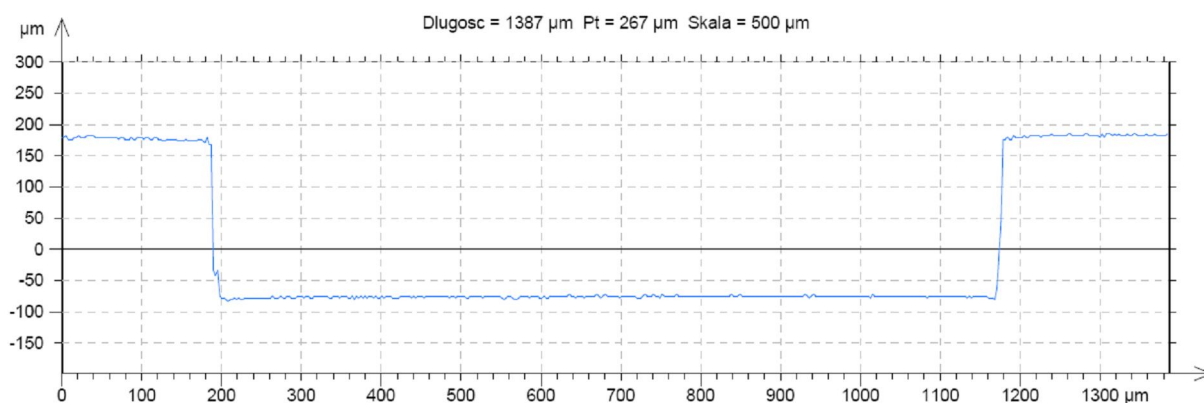
Konfokální mikroskopie CLSM

Měření geometrie mikrostruktury

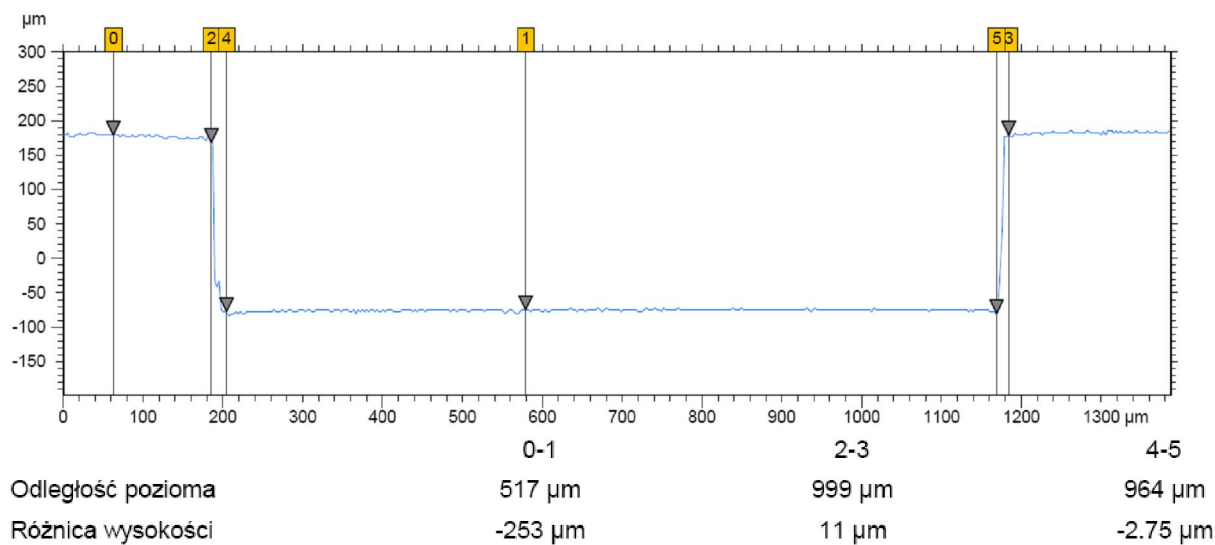
Mikrozásobník



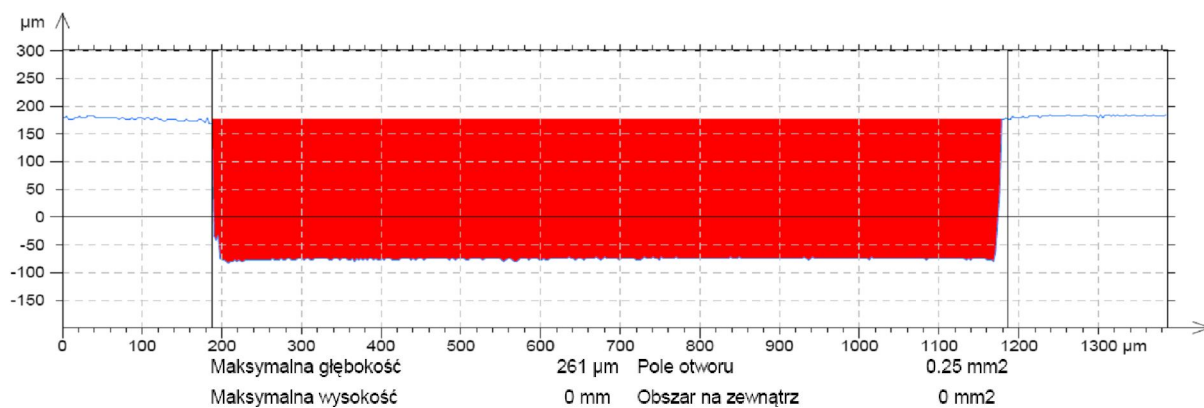
Obr. 1 Obrázek CLSM mikrozásobníku: a) s vyznačenými místy řezu, b) zobrazení ve 3D



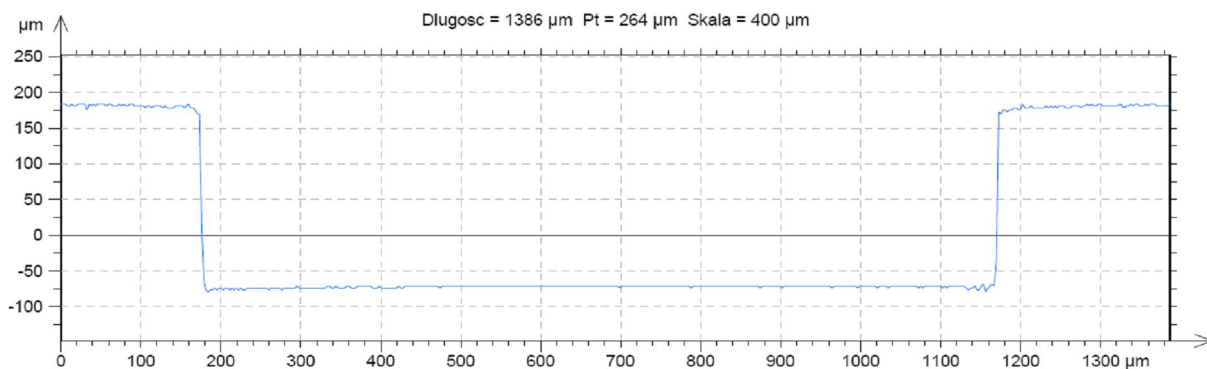
Obr. 2 Profil mikrozásobníku v řezu A



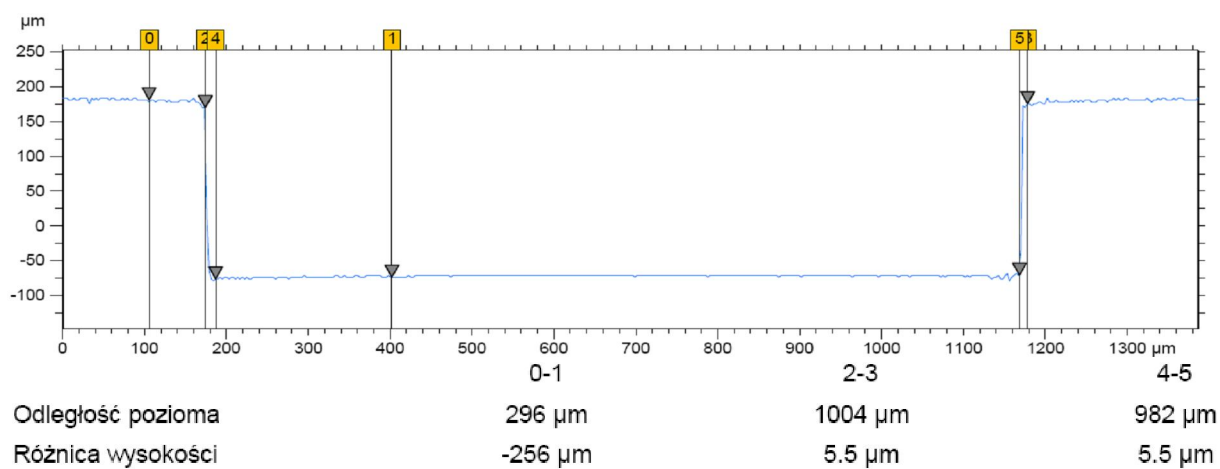
Obr. 3 Geometrické měření mikrozásobníku v řezu A



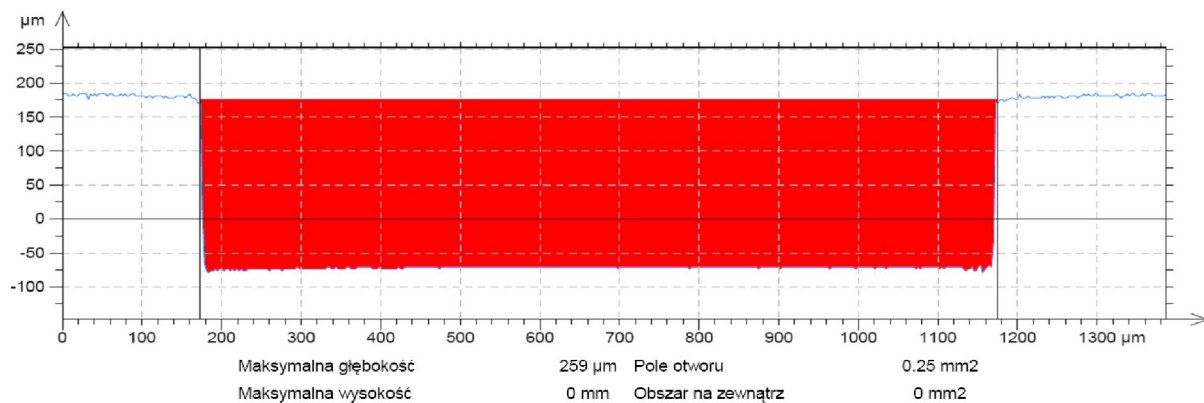
Obr. 4 Měření pole řezu v místě A



Obr. 5 Profil mikrozasobníku v místě řezu B

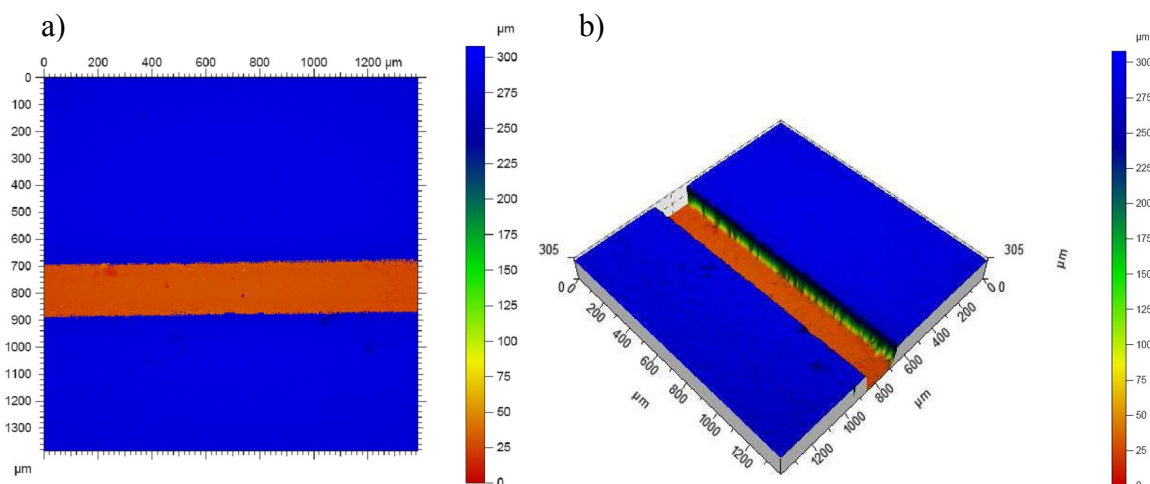


Obr. 6 Geometrické měření mikrozasobníku v místě řezu B

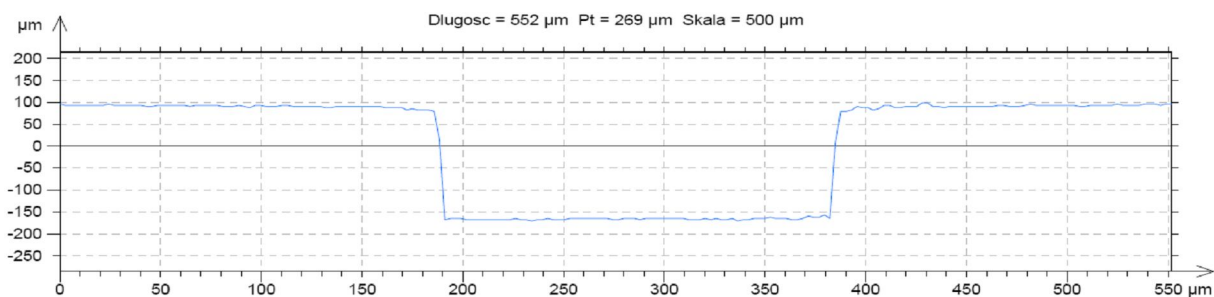


Obr. 7 Měření pole řezu v místě řezu B

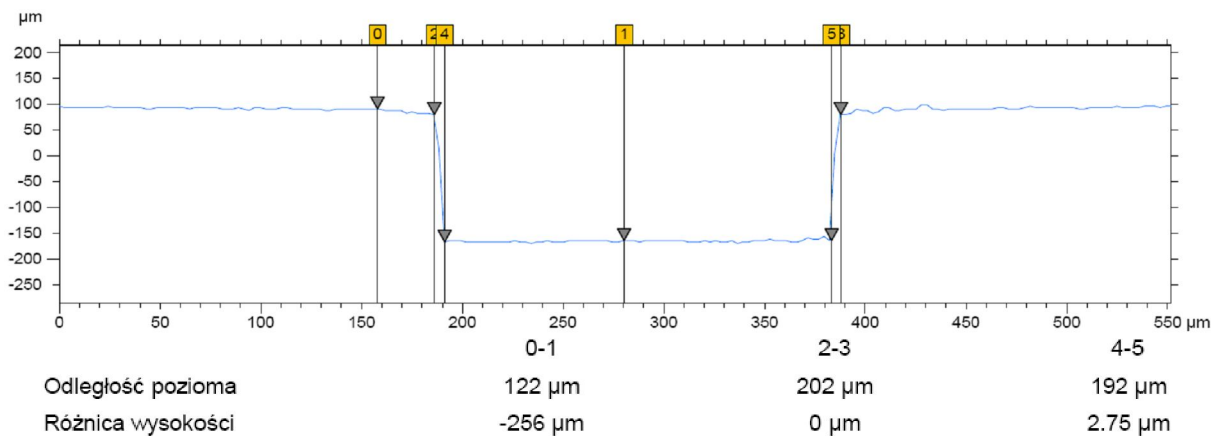
Spojovací mikrokanál



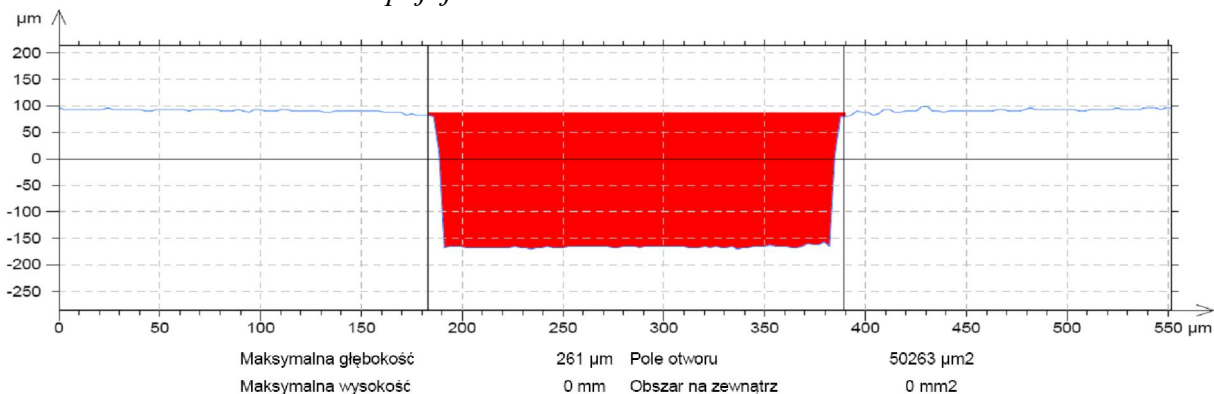
Obr. 8 Obrázek CLSM spojujícího kanálu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D



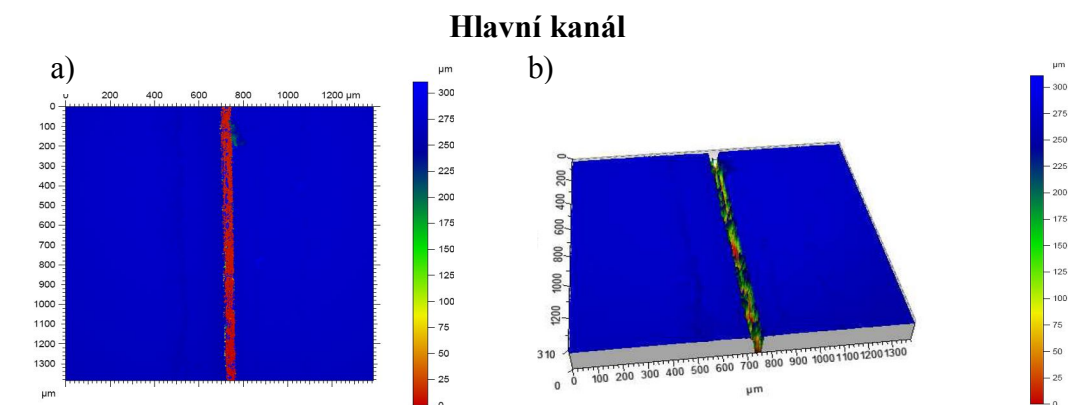
Obr. 9 Profil spojujícího mikrokanálu



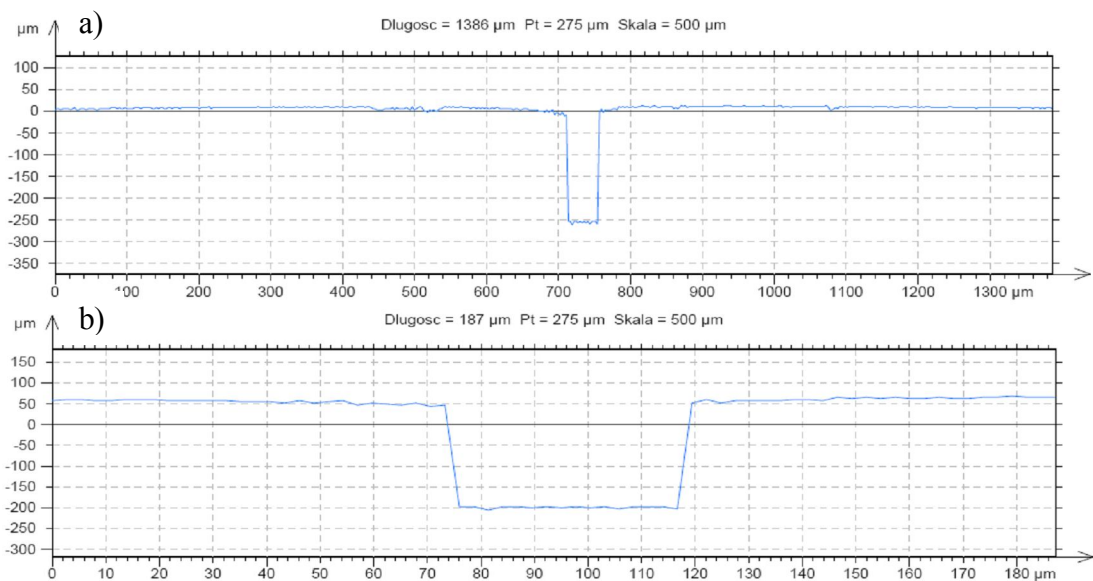
Obr. 10 Geometrické měření spojujícího mikrokanálu



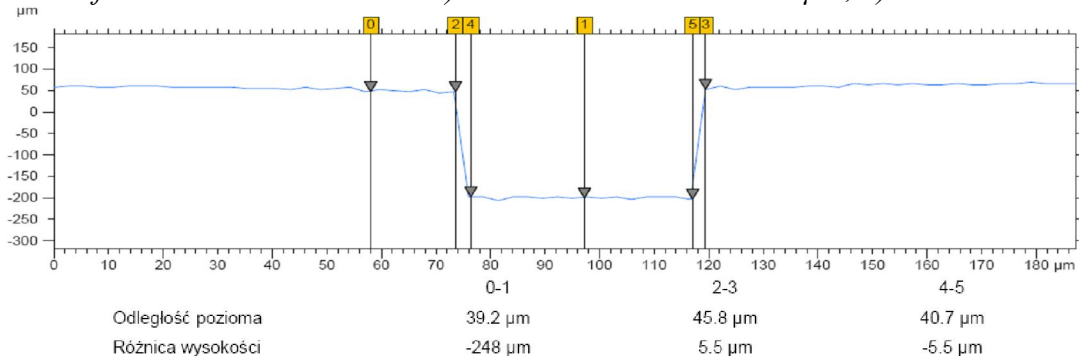
Obr. 11 Měření pole řezu spojujícího mikrokanálu



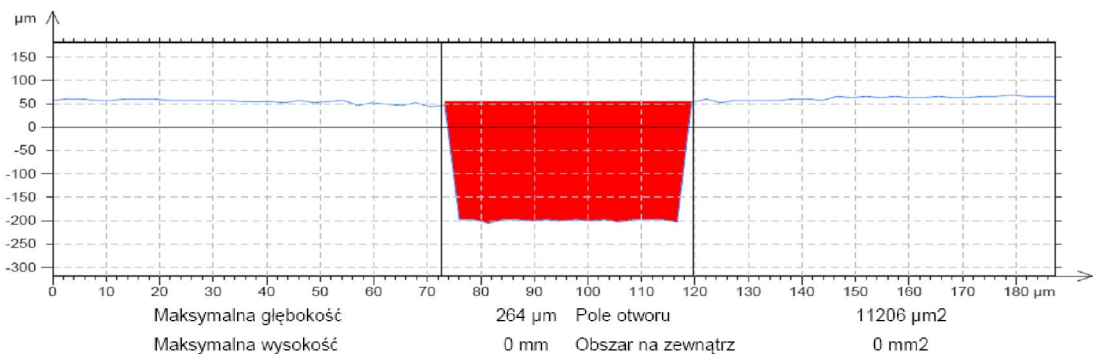
Obr. 12 Obrázek CLSM hlavního kanálu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D



Obr. 13 Profil hlavního mikrokanálu: a) na měřeném rozsahu 1386 μm , b) na rozsahu 187 μm



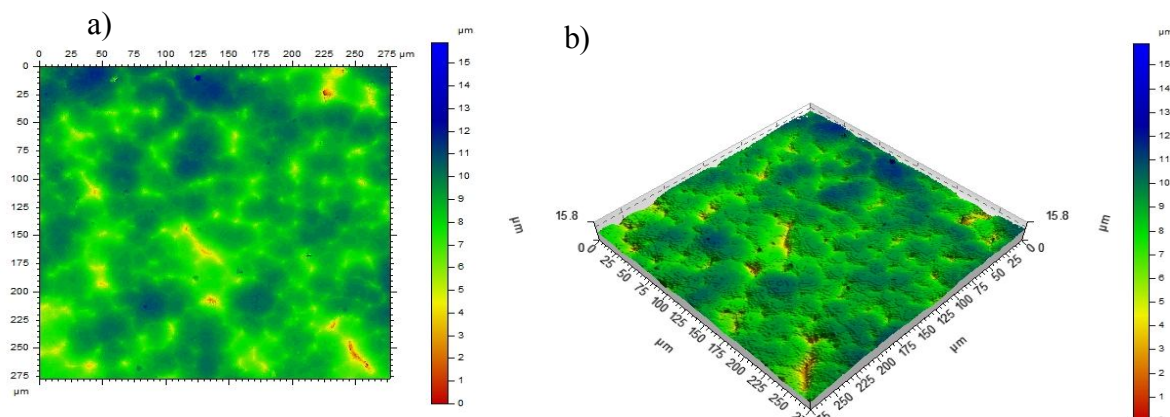
Obr. 14 Geometrické měření hlavního mikrokanálu



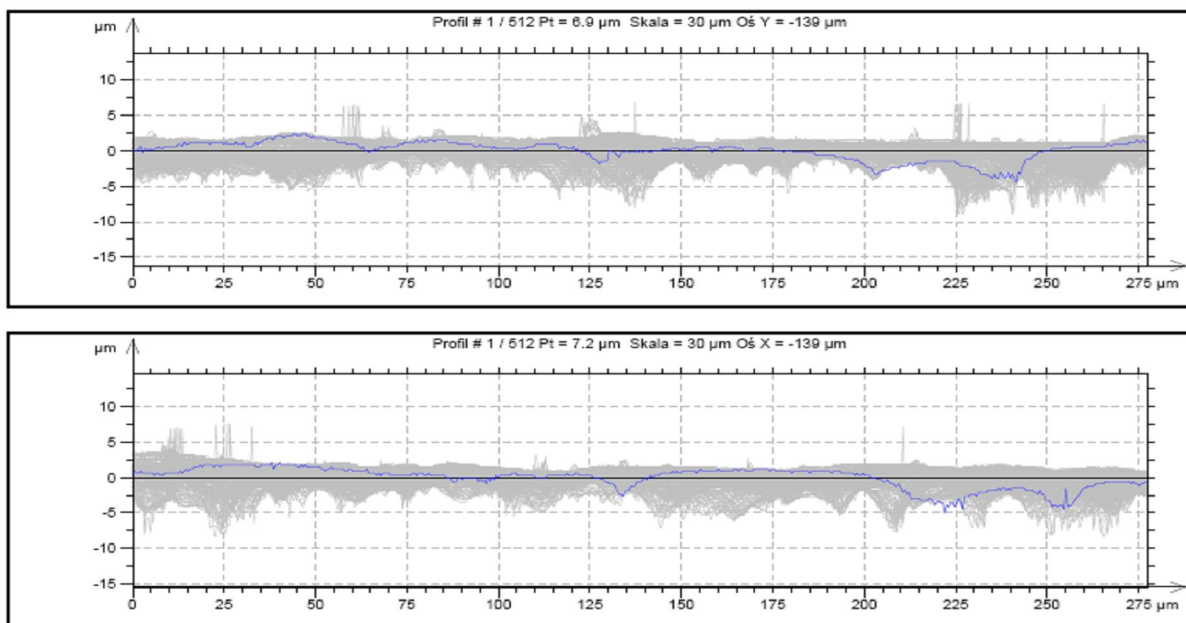
Obr. 15 Měření pole řezu hlavního mikrokanálu

Zkoumání morfologie povrchu diamantové mikrostruktury

Měření 1



Obr. 16 Obrázek CLSM morfologie povrchu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D



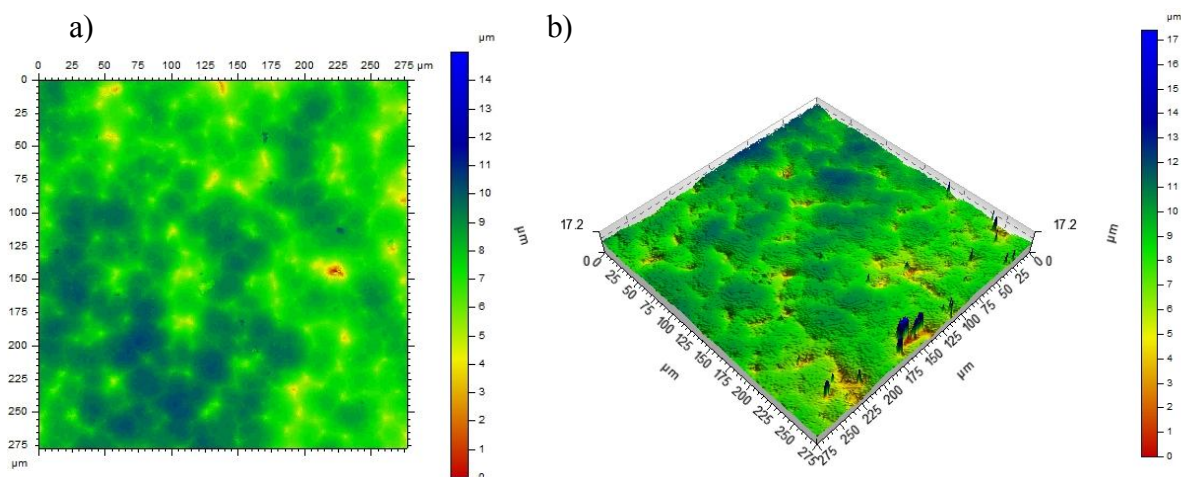
Obr. 17 Profily drsnosti naměřené ve dvou místech

ISO 4287						
Opis			Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości						
Rp	μm	Rp: Maksymalna wysokość piku profilu chropowatości.	0.814	0.46	0.3	4.5
Rv	μm	Rv: Maksymalna głębokość doliny profilu chropowatości.	1.68	0.662	0.3	3.75
Rz	μm	Rz: Maksymalna wysokość profilu chropowatości.	2.5	0.949	0.75	7.95
Rc	μm	Rc: Średnia wysokość elementów profilu chropowatości.	2.22	0.847	0.825	8.1
Rt	μm	Rt: Całkowita wysokość profilu chropowatości.	3.69	1.75	1.2	15.6
Ra	μm	Ra: Odchylenie średnie arytmetyczne profilu chropowatości.	0.315	0.103	0.0983	0.566
Rq	μm	Rq: Odchylenie średnie kwadratowe profilu chropowatości.	0.484	0.146	0.193	0.869

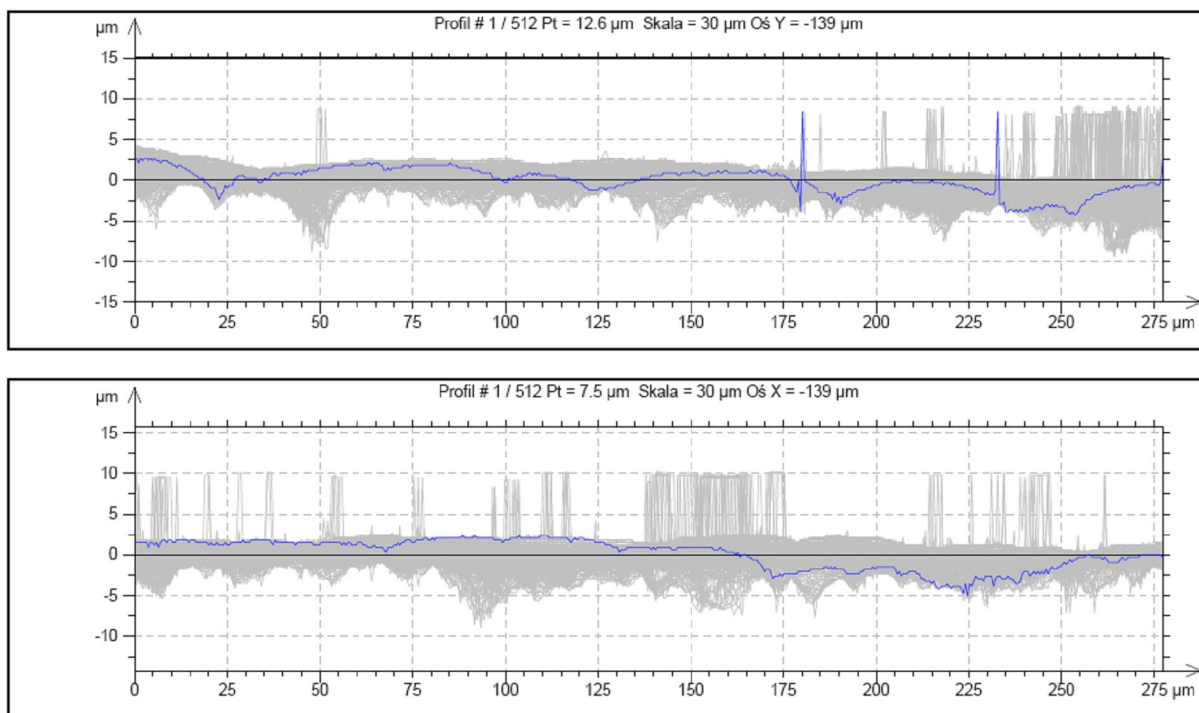
ISO 4287						
Opis			Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości						
Rp	μm	Rp: Maksymalna wysokość piku profilu chropowatości.	0.728	0.211	0.3	1.65
Rv	μm	Rv: Maksymalna głębokość doliny profilu chropowatości.	1.56	0.618	0.45	3.45
Rz	μm	Rz: Maksymalna wysokość profilu chropowatości.	2.29	0.702	0.9	4.2
Rc	μm	Rc: Średnia wysokość elementów profilu chropowatości.	1.92	0.566	0.7	4.45
Rt	μm	Rt: Całkowita wysokość profilu chropowatości.	3.2	1.23	0.9	14.4
Ra	μm	Ra: Odchylenie średnie arytmetyczne profilu chropowatości.	0.286	0.104	0.0943	0.536
Rq	μm	Rq: Odchylenie średnie kwadratowe profilu chropowatości.	0.448	0.142	0.185	0.826

Obr. 18 Získané hodnoty drsnosti pro jednotlivá měření

Měření 2



Obr. 19 Obráz CLSM morfologie povrchu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení 3D



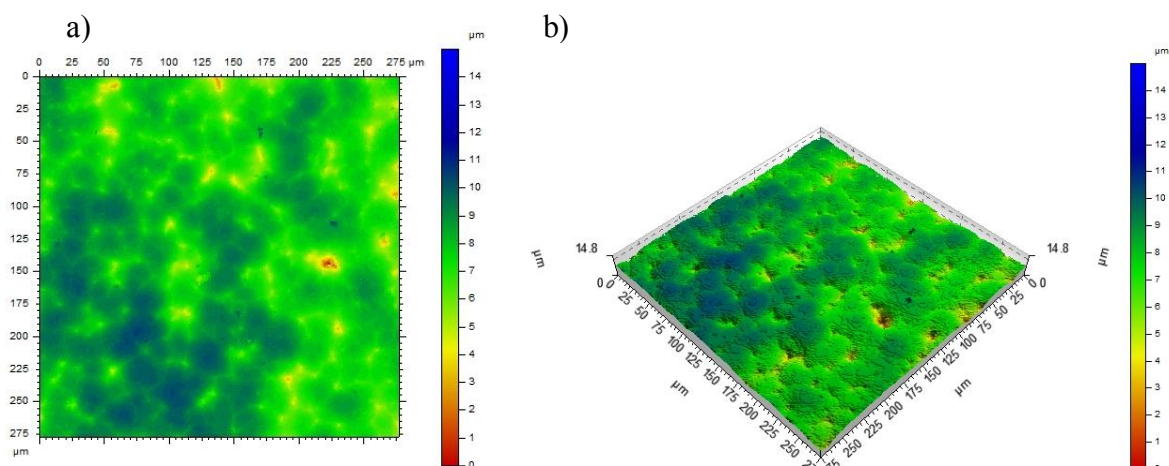
Obr. 20 Profily drsnosti naměřené ve dvou místech

ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	0.818	0.458	0.45	5.25
Rv	μm	1.68	0.624	0.6	4.35
Rz	μm	2.5	0.85	1.2	8.1
Rc	μm	2.19	0.81	1.05	7.9
Rt	μm	3.77	2.25	1.5	15.3
Ra	μm	0.321	0.0991	0.148	0.772
Rq	μm	0.491	0.136	0.268	1.18

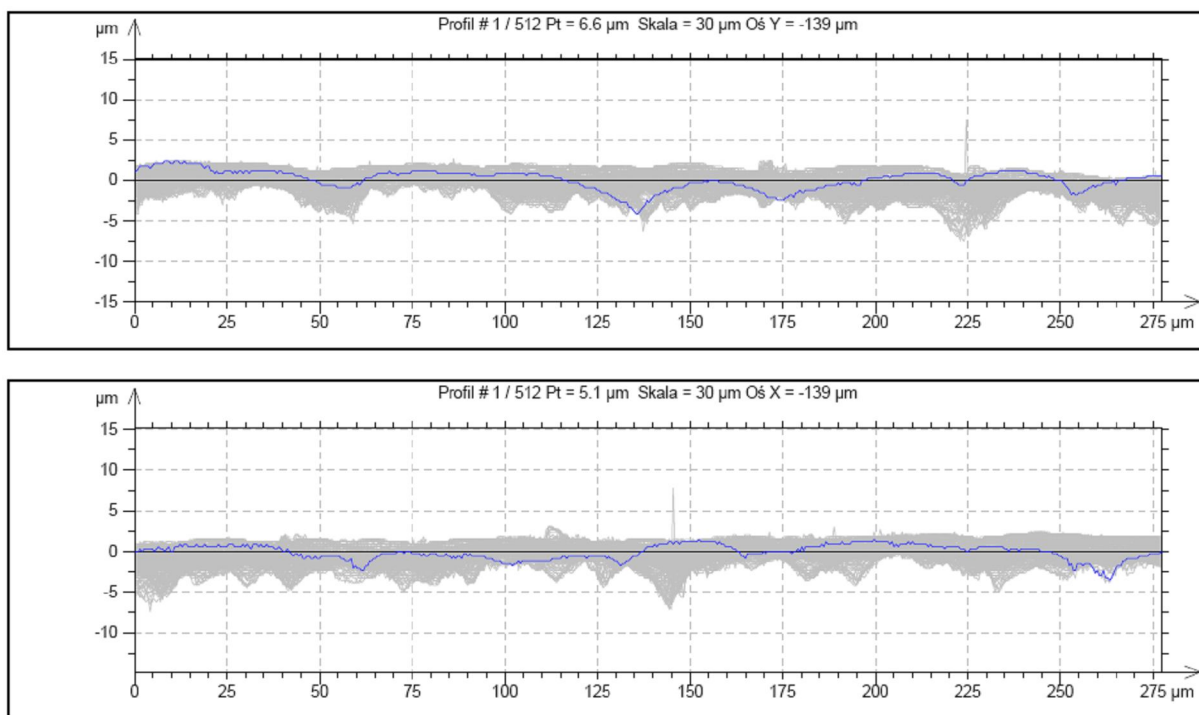
ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	1.27	1.54	0.45	10
Rv	μm	1.61	0.66	0.45	4.5
Rz	μm	2.88	1.96	0.9	12.2
Rc	μm	2.43	1.68	1.05	11
Rt	μm	4.38	3.55	1.5	17.7
Ra	μm	0.354	0.186	0.165	1.37
Rq	μm	0.551	0.323	0.252	2.12

Obr. 21 Získané hodnoty drsnosti pro jednotlivá měření

Měření 3



Obr. 22 Obráz CLSM morfologie povrchu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D



Obr. 23 Profily drsnosti naměřené ve dvou místech

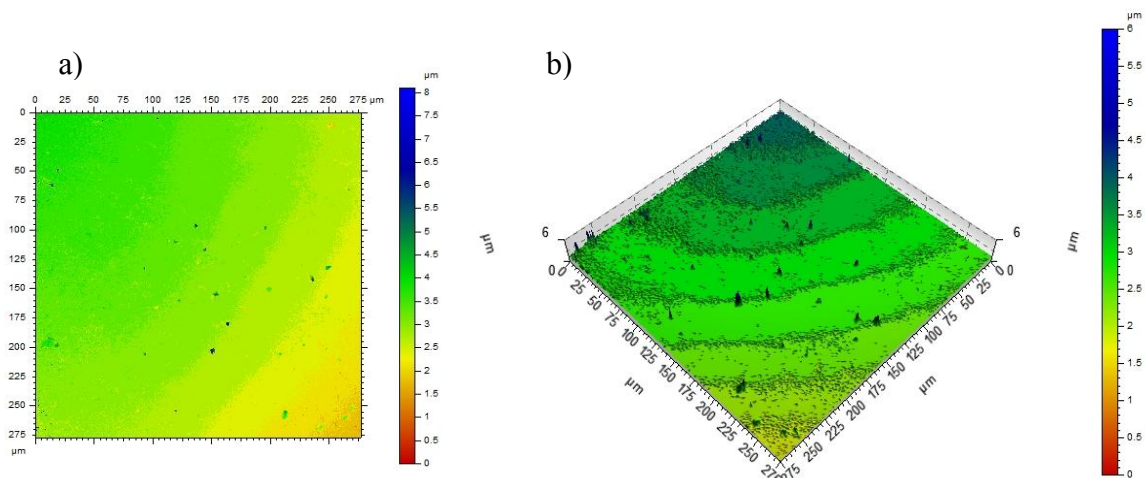
ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowości					
Rp	μm	0.692	0.209	0.3	1.5
Rv	μm	1.37	0.513	0.45	3.75
Rz	μm	2.07	0.622	1.05	4.65
Rc	μm	1.86	0.571	0.8	4.65
Rt	μm	2.78	0.984	1.2	13.5
Ra	μm	0.283	0.102	0.0963	0.644
Rq	μm	0.431	0.132	0.18	0.861

ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	0.645	0.311	0.15	4.8
Rv	μm	1.29	0.597	0.3	3.6
Rz	μm	1.94	0.822	0.6	8.25
Rc	μm	1.75	0.822	0.675	7.9
Rt	μm	2.64	1.2	0.9	13.8
Ra	μm	0.25	0.119	0.0699	0.626
Rq	μm	0.393	0.163	0.144	1

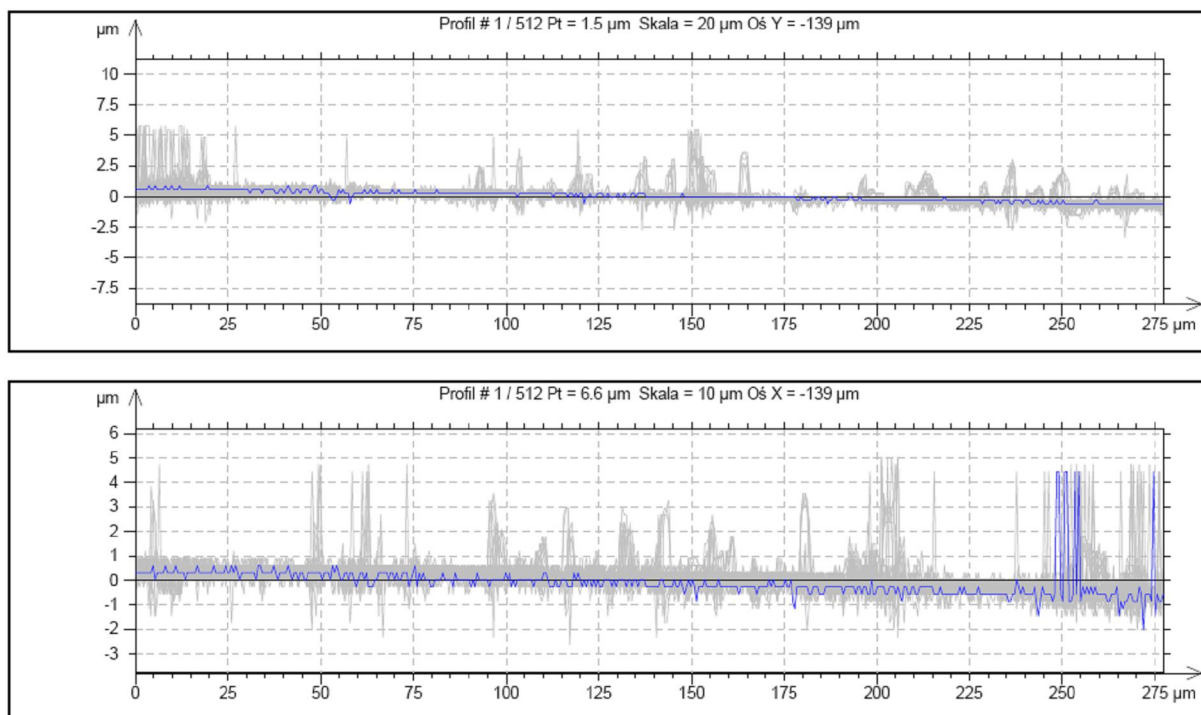
Obr. 24 Získané hodnoty drsnosti pro jednotlivá měření

Zkoumání morfologie povrchu dna kanálu

Měření 1



Obr. 25 Obráz CLSM morfologie povrchu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D

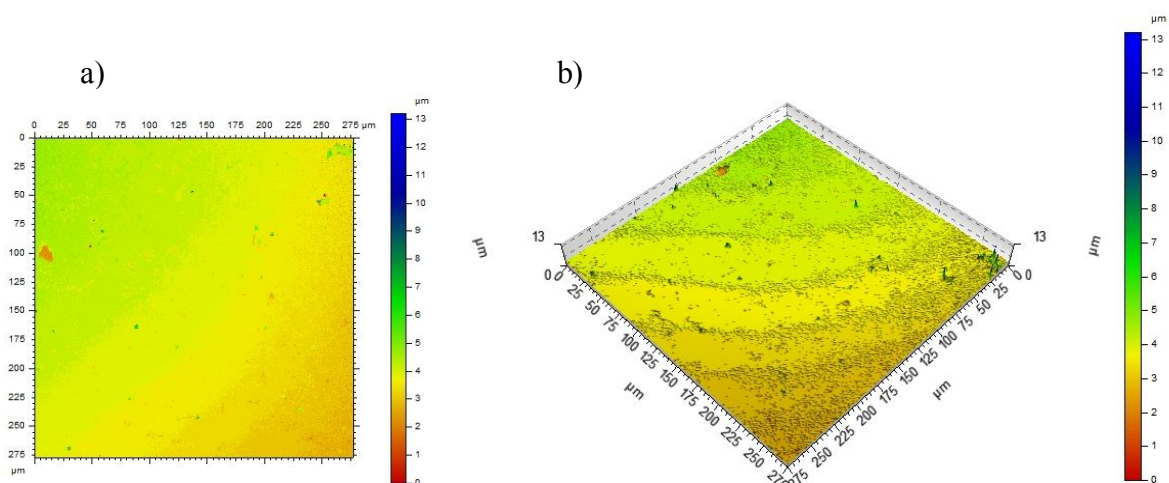


Obr. 26 Profily drsnosti naměřené ve dvou místech

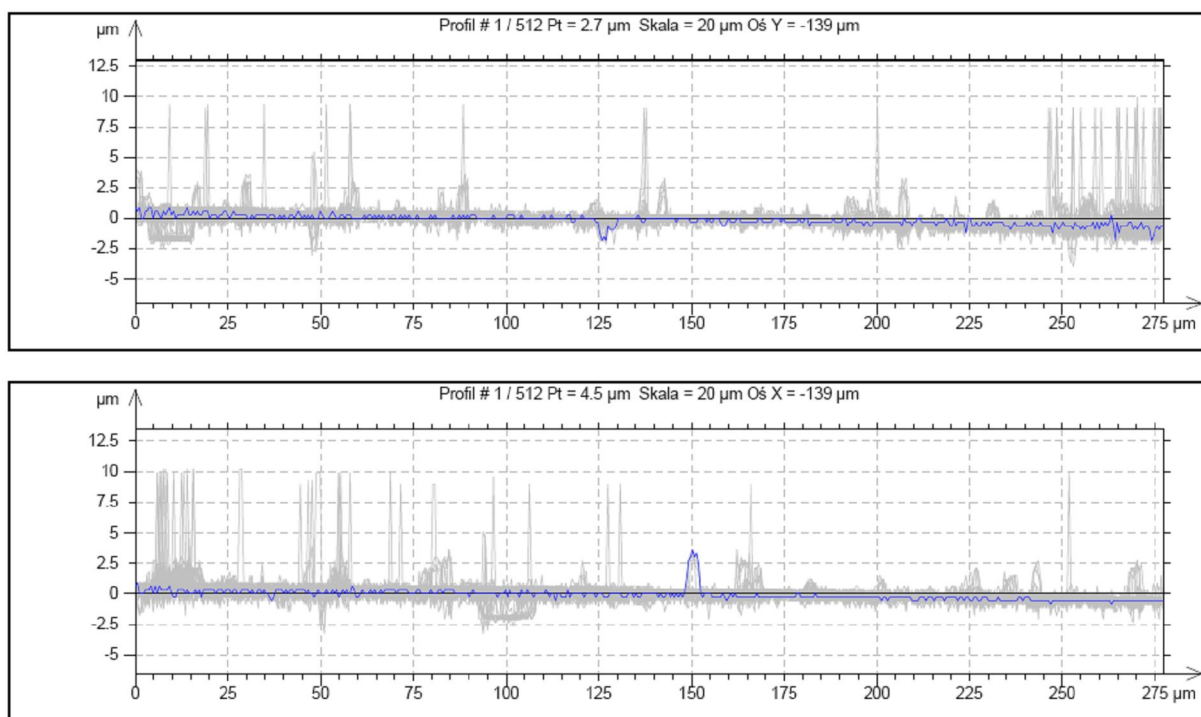
ISO 4287						ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max			Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości						Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	0.266	0.441	0	3	Rp	μm	0.327	0.48	0	3.3
Rv	μm	0.242	0.231	0	1.35	Rv	μm	0.26	0.259	0	1.5
Rz	μm	0.508	0.6	0	4.35	Rz	μm	0.587	0.656	0	4.8
Rc	μm	1.97	1.45	0.6	6.6	Rc	μm	1.23	0.969	0.6	5.7
Rt	μm	0.991	1.13	0	7.2	Rt	μm	1.06	1.24	0	6.9
Ra	μm	0.00788	0.0132	0	0.104	Ra	μm	0.0105	0.0144	0	0.0821
Rq	μm	0.0472	0.0602	0	0.39	Rq	μm	0.0551	0.0616	0	0.38

Obr. 27 Získané hodnoty drsnosti pro jednotlivá měření

Měření 2



Obr. 28 Obráz CLSM morfologie povrchu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D



Obr. 29 Profily drsnosti naměřené ve dvou místech

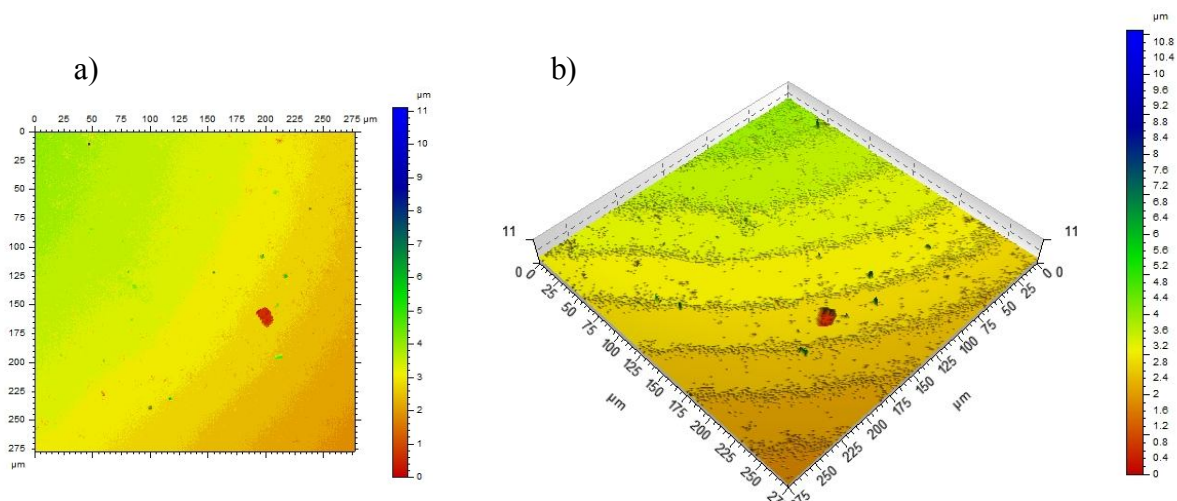
ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	0.32	0.585	0	4.8
Rv	μm	0.346	0.27	0	1.95
Rz	μm	0.666	0.732	0	5.4
Rc	μm	1.38	1.3	0.6	9.9
Rt	μm	1.25	1.32	0	9.9
Ra	μm	0.0106	0.012	0	0.077
Rq	μm	0.06	0.0623	0	0.44

ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	0.466	0.802	0	4.8
Rv	μm	0.482	0.332	0	2.1
Rz	μm	0.948	0.98	0	6.9
Rc	μm	1.34	0.934	0.6	6.9
Rt	μm	1.55	1.79	0	12.9
Ra	μm	0.0238	0.0337	0	0.202
Rq	μm	0.0958	0.098	0	0.726

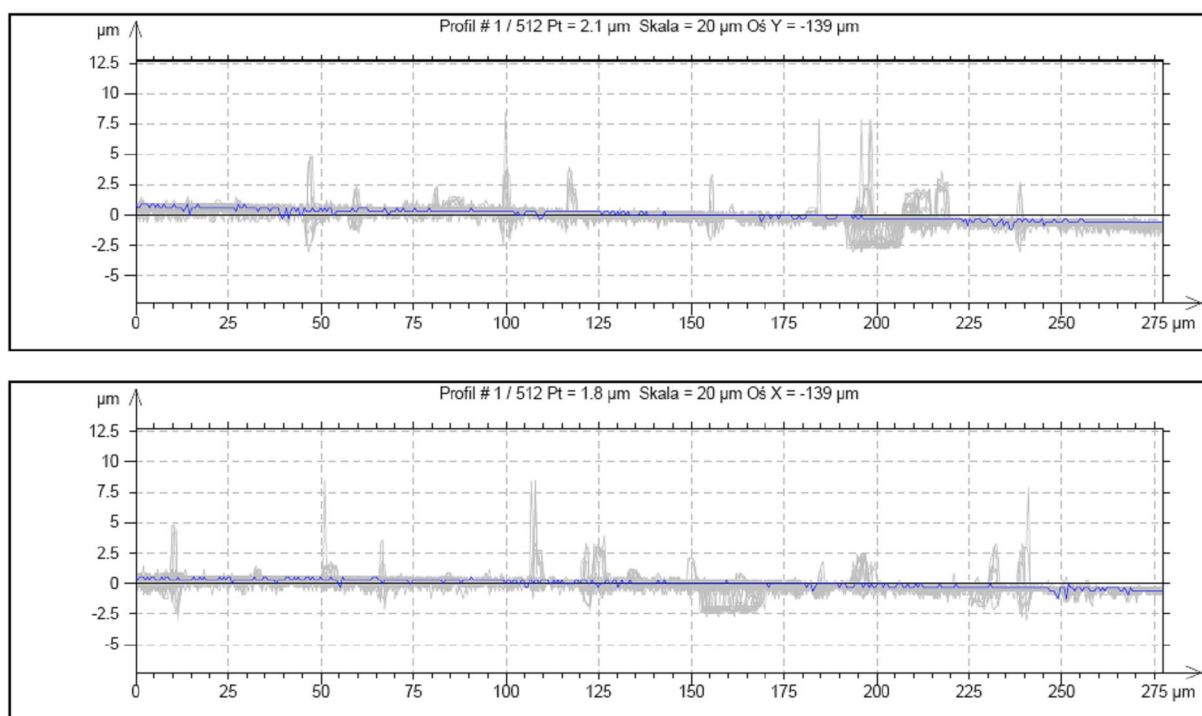
Obr. 30 Získané hodnoty drsnosti pro jednotlivá měření



Měření 3



Obr. 31 Obrázek CLSM morfologie povrchu: a) plošné zobrazení, b) zobrazení ve 3D



Obr. 32 Profily drsnosti naměřené ve dvou místech

ISO 4287						ISO 4287					
		Mean	Std dev	Min	Max			Mean	Std dev	Min	Max
Parametry amplitudy – profil chropowatości						Parametry amplitudy – profil chropowatości					
Rp	μm	0.185	0.483	0	4.05	Rp	μm	0.205	0.474	0	4.2
Rv	μm	0.323	0.299	0	1.65	Rv	μm	0.342	0.272	0	1.65
Rz	μm	0.507	0.66	0	4.8	Rz	μm	0.547	0.628	0	5.85
Rc	μm	1.89	1.34	0.6	8.4	Rc	μm	1.82	1.21	0.6	5.7
Rt	μm	1.01	1.25	0	9.6	Rt	μm	0.984	1.11	0	9.9
Ra	μm	0.01	0.0179	0	0.104	Ra	μm	0.0141	0.0346	0	0.22
Rq	μm	0.0518	0.0672	0	0.502	Rq	μm	0.0596	0.0822	0	0.627

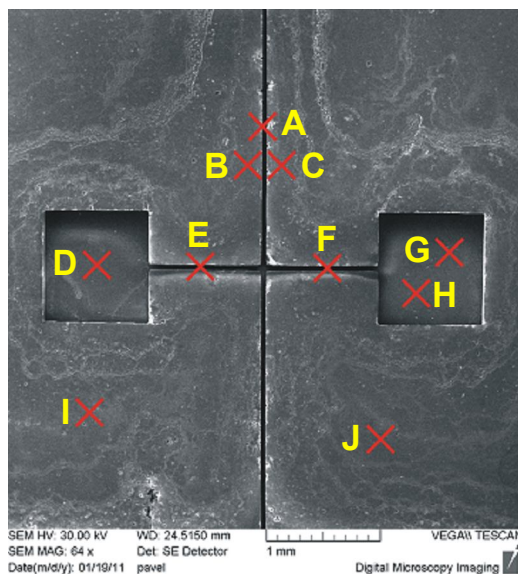
Obr. 33 Získané hodnoty drsnosti pro jednotlivá měření



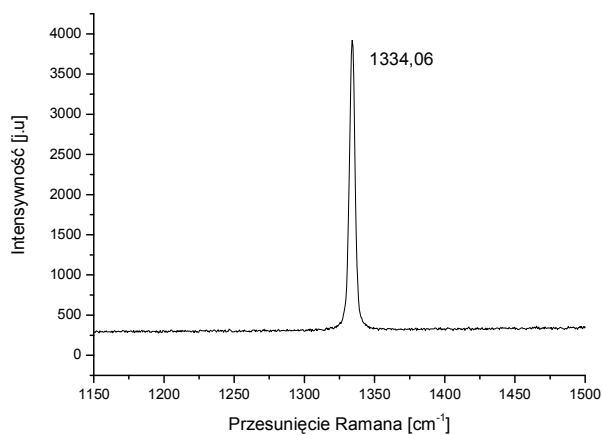
Příloha 4

Ramanova spektroskopie

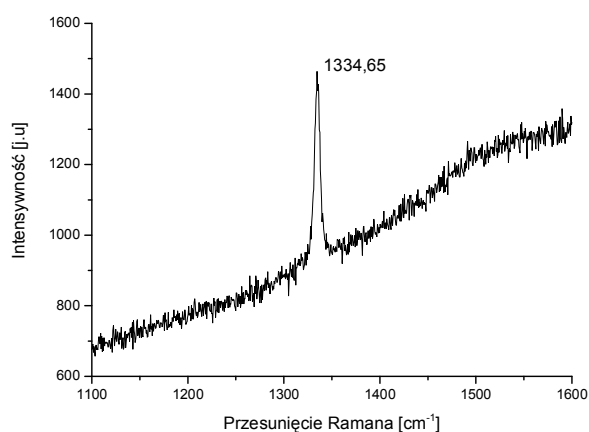
Příklady spekter získané pomocí ramanovy spektroskopie v jednotlivých místech označených na obrázku 1 diamantové mikrostruktury.



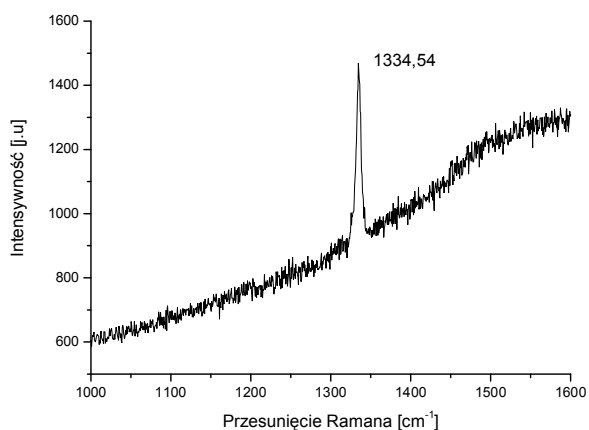
Obr. 1 Snímek SEM s vyznačenými místy měření



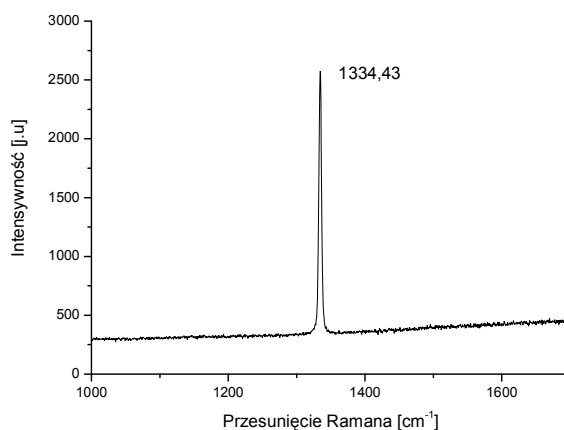
Obr. 2 Ramanovo spektrum mikrokanálu „A''



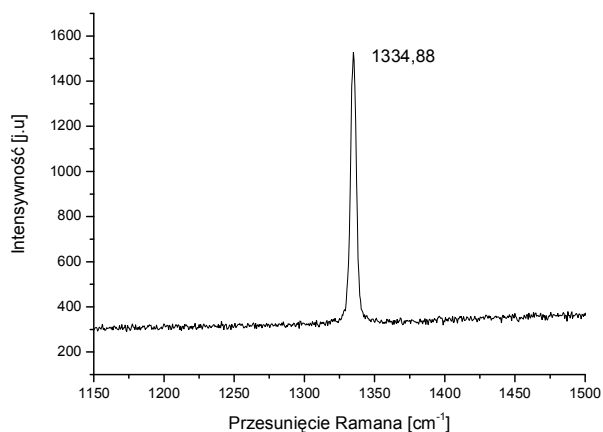
Obr. 3 Ramanovo spektrum mikrokanálu „B''



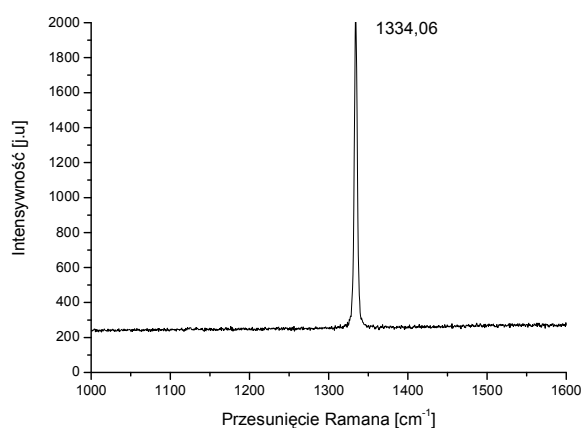
Obr. 4 Ramanovo spektrum mikrokanálu „C''



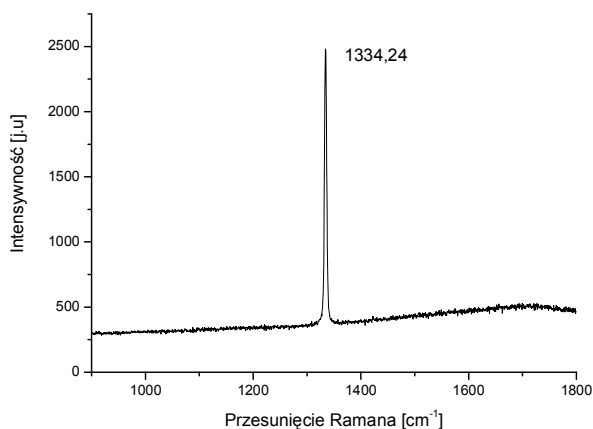
Obr. 5 Ramanovo spektrum mikrokanálu „D''



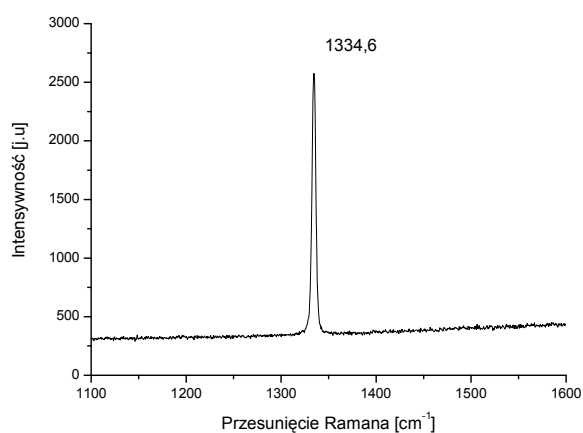
Obr. 6 Ramanovo spektrum mikrokanálu „E”



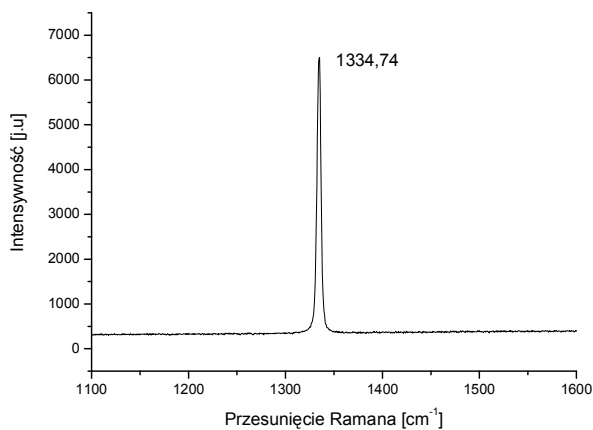
Obr. 7 Ramanovo spektrum na okraji „F”



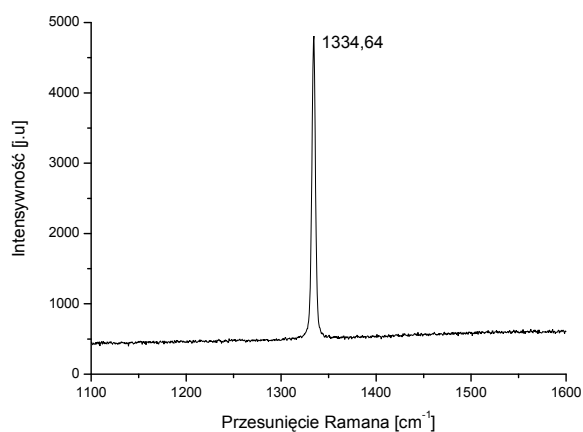
Obr.8 Ramanovo spektrum mikrozásobníku „G”



Obr. 9 Ramanovo spektrum mikrozásobníku „H”



Obr. 10 Ramanovo spektrum povrchu „I”

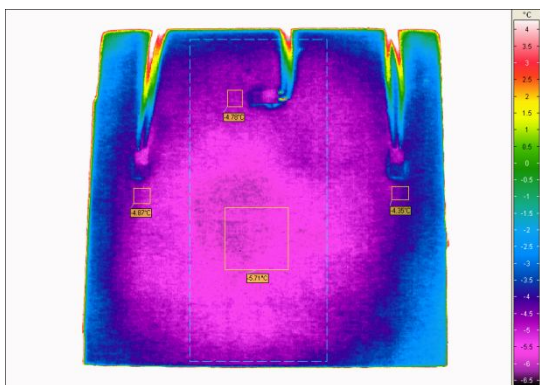


Obr. 11 Ramanovo spektrum povrchu „J”

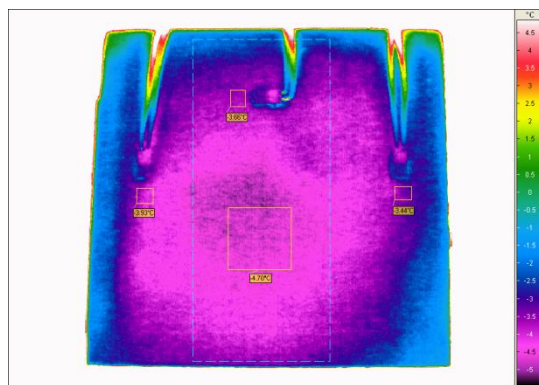


Příloha 5

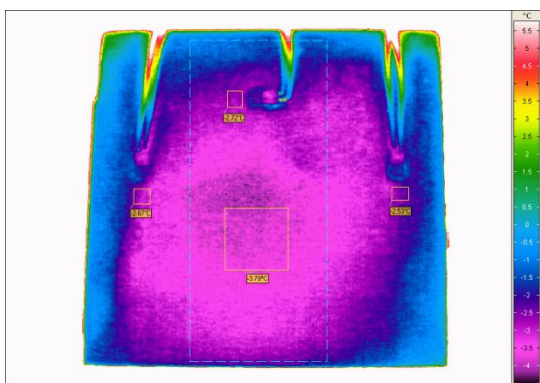
Rozložení teploty na povrchu Peltierova článku



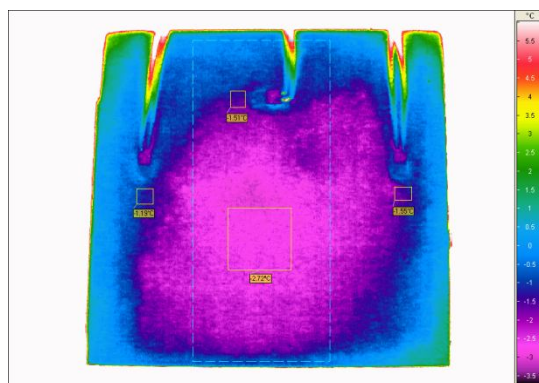
Obr. 1 Termogram při teplotě -5°C



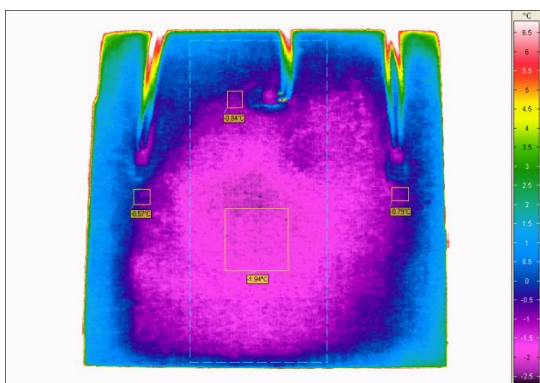
Obr. 2 Termogram při teplotě -4°C



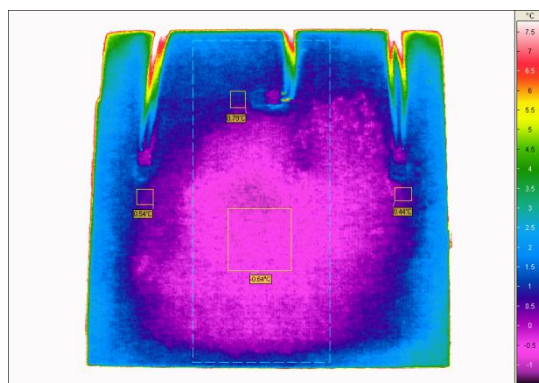
Obr. 3 Termogram při teplotě -3°C



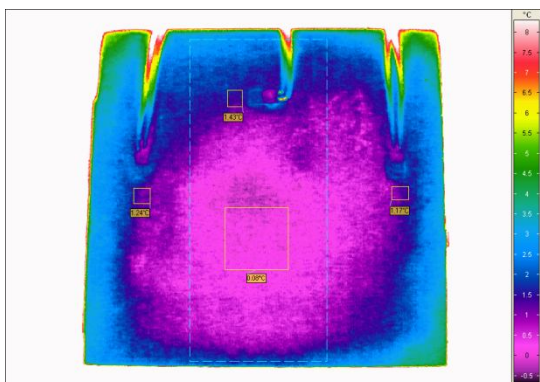
Obr. 4 Termogram při teplotě -2°C



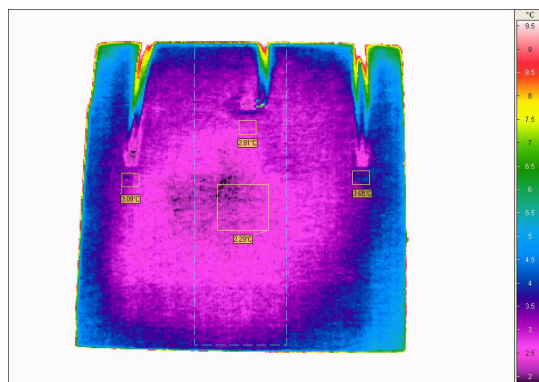
Obr. 5 Termogram při teplotě -1°C



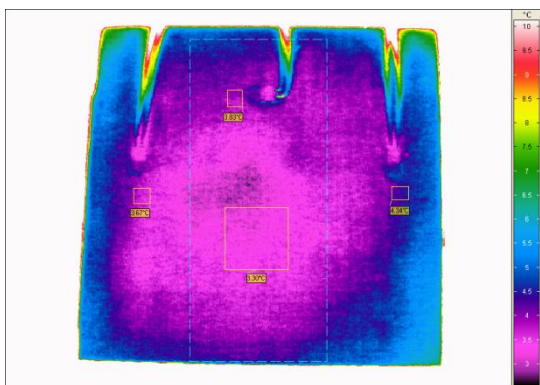
Obr. 6 Termogram při teplotě 0°C



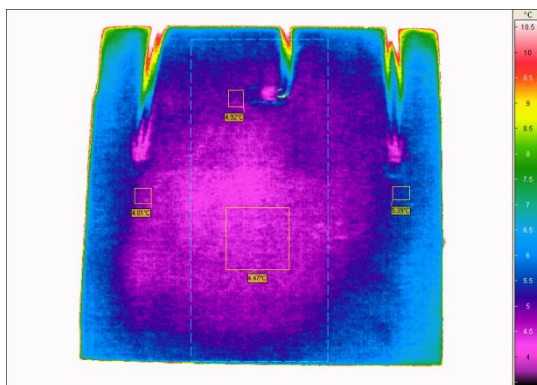
Obr. 7 Termogram při teplotě 1°C



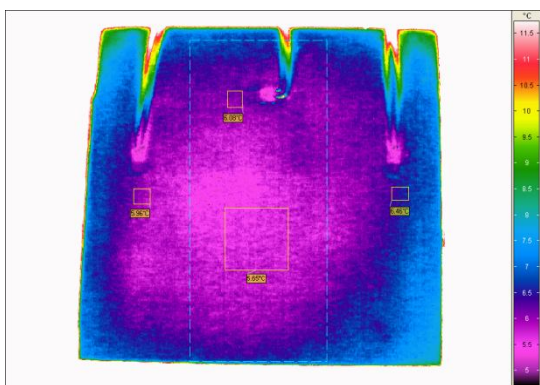
Obr. 8 Termogram při teplotě 2°C



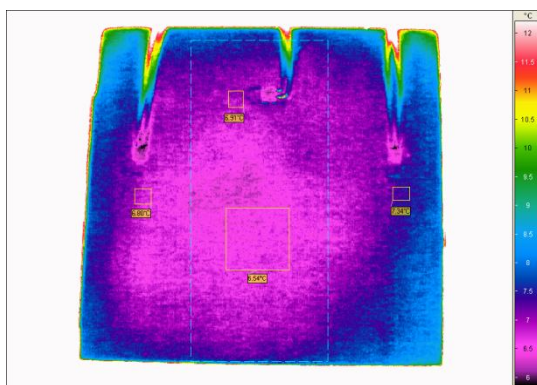
Obr. 9 Termogram při teplotě 3°C



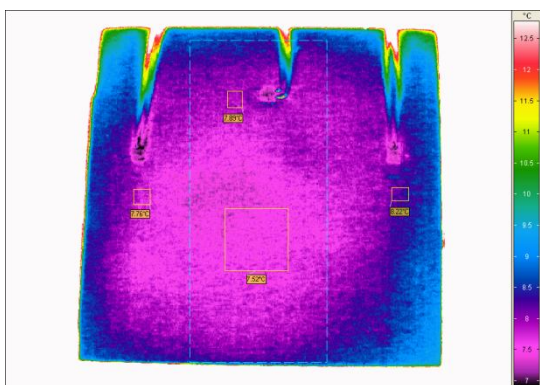
Obr. 10 Termogram při teplotě 4°C



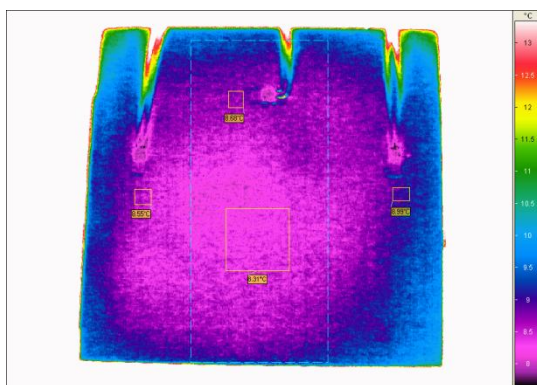
Obr. 11 Termogram při teplotě 5°C



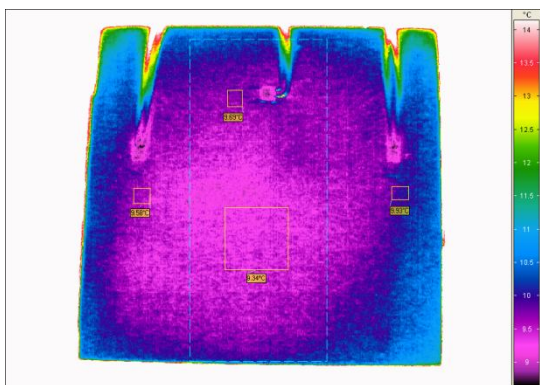
Obr. 12 Termogram při teplotě 6°C



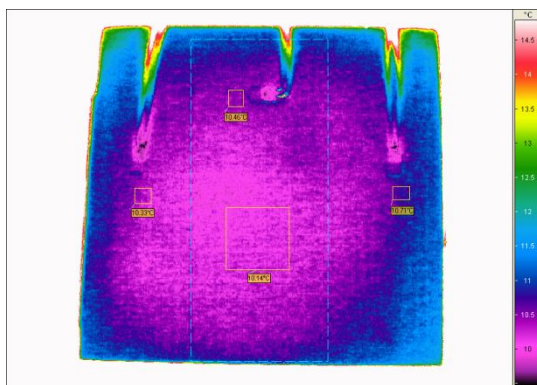
Obr. 13 Termogram při teplotě 7°C



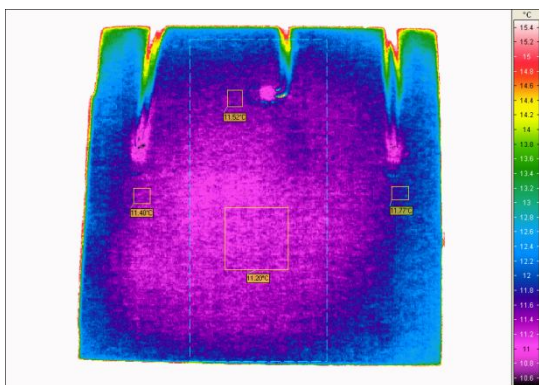
Obr. 14 Termogram při teplotě 8°C



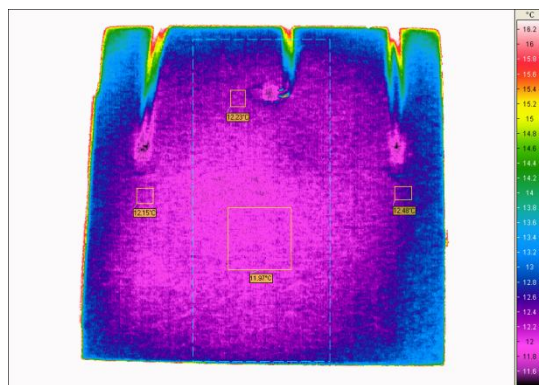
Obr. 15 Termogram při teplotě 9°C



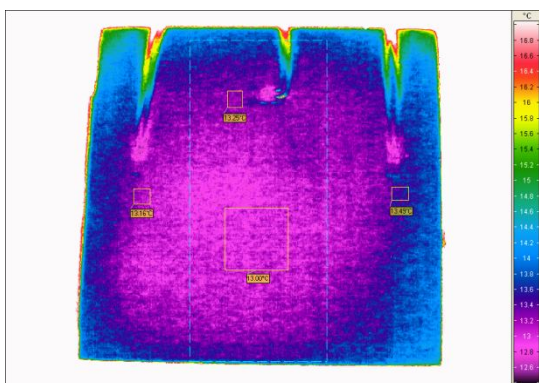
Obr. 16 Termogram při teplotě 10°C



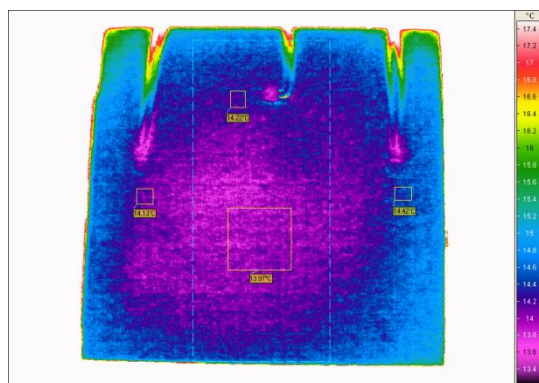
Obr. 17 Termogram při teplotě 11°C



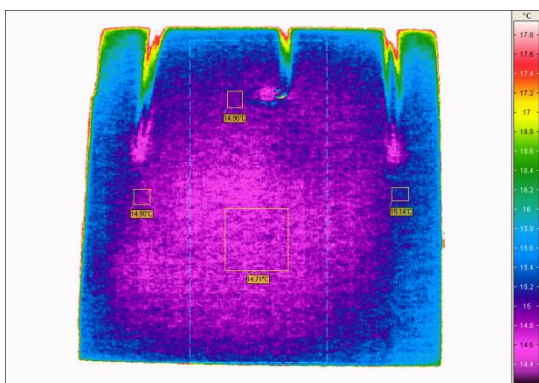
Obr. 18 Termogram při teplotě 12°C



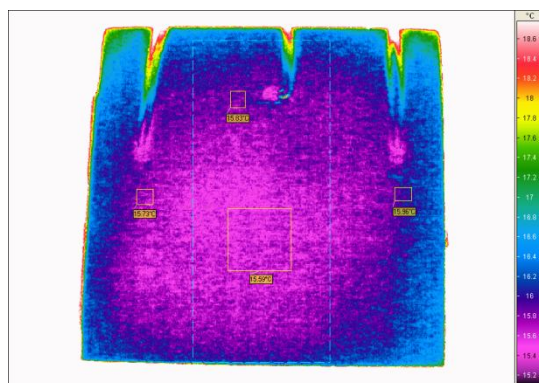
Obr. 19 Termogram při teplotě 13°C



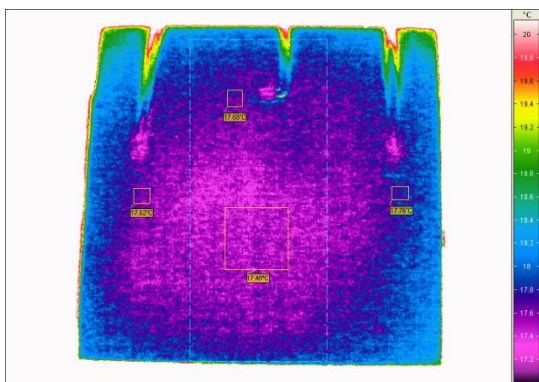
Obr. 20 Termogram při teplotě 14°C



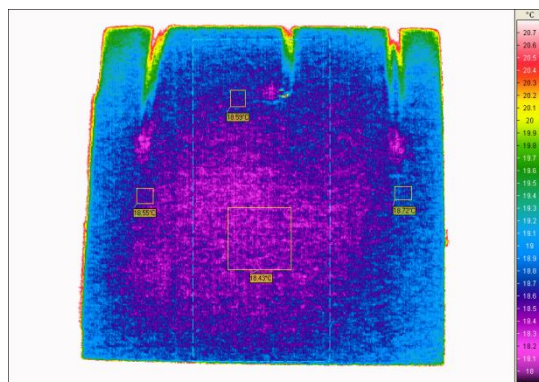
Obr. 21 Termogram při teplotě 15°C



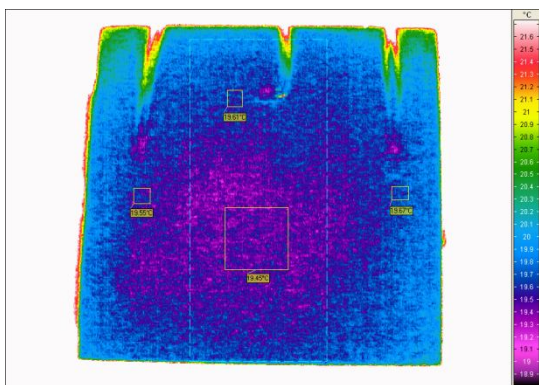
Obr. 22 Termogram při teplotě 16°C



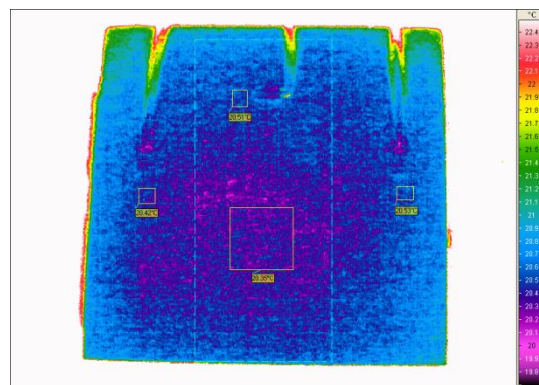
Obr. 23 Termogram při teplotě 17°C



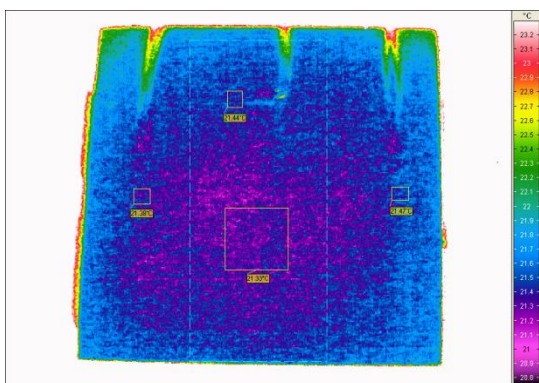
Obr. 24 Termogram při teplotě 18°C



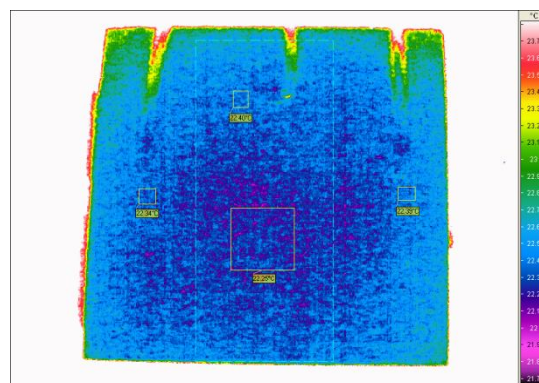
Obr. 25 Termogram při teplotě 19°C



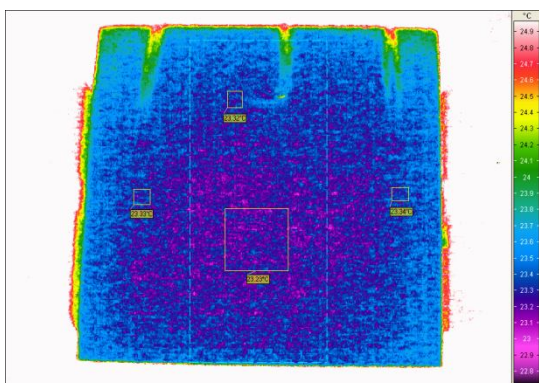
Obr. 26 Termogram při teplotě 20°C



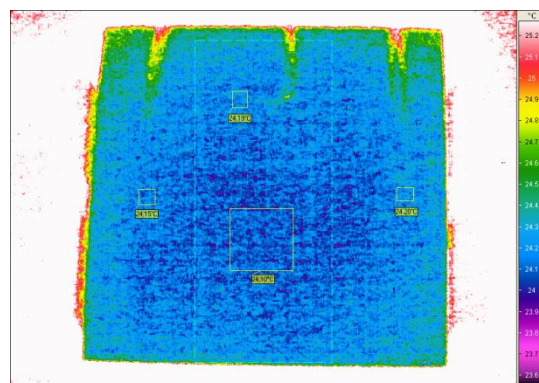
Obr. 27 Termogram při teplotě 21°C



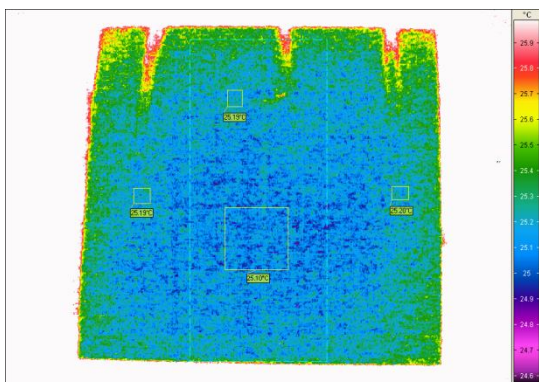
Obr. 28 Termogram při teplotě 22°C



Obr. 29 Termogram při teplotě 23°C



Obr. 30 Termogram při teplotě 24°C

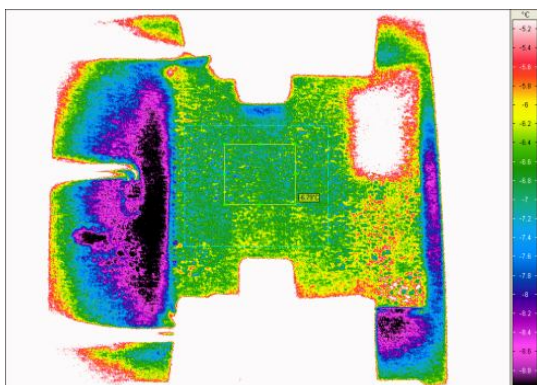


Obr. 31 Termogram při teplotě 25°C

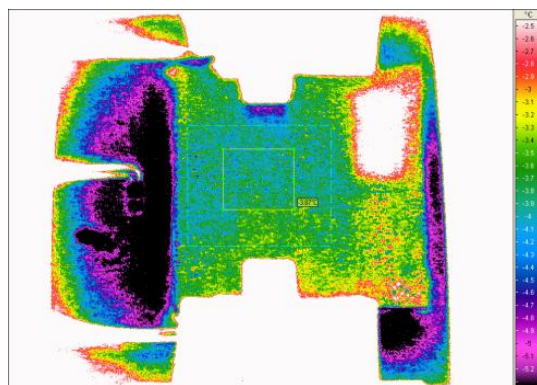


Příloha 6

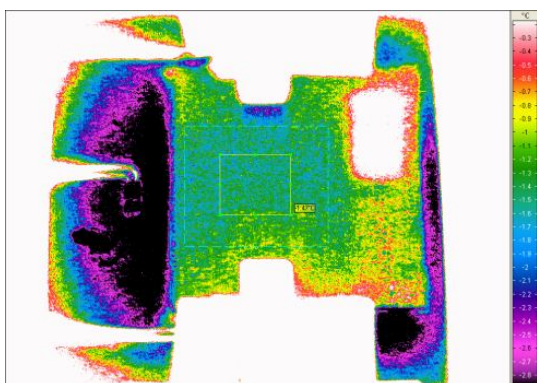
Rozložení teploty na povrchu mikročipu v průběhu chlazení



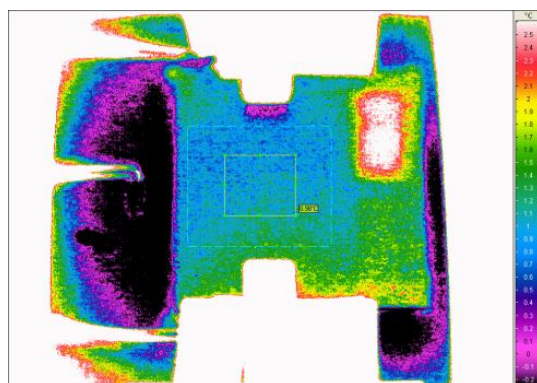
Obr. 1 Při teplotě -2°C



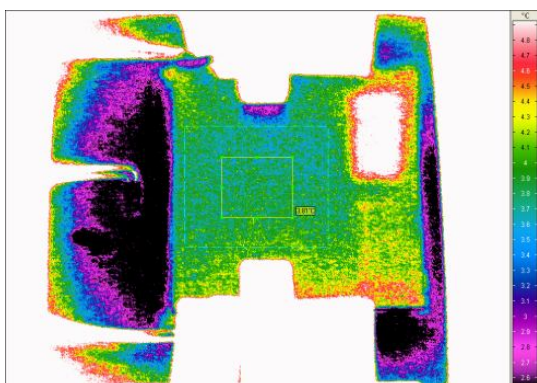
Obr. 2 Při teplotě 0°C



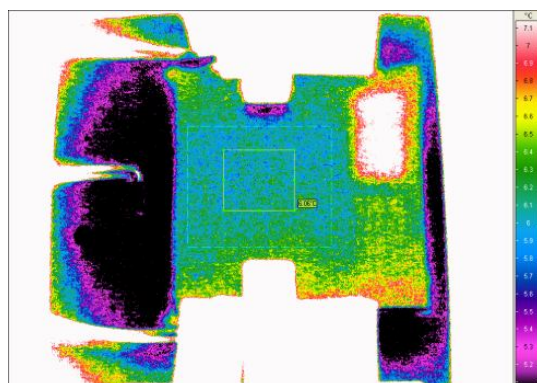
Obr. 3 Při teplotě 2°C



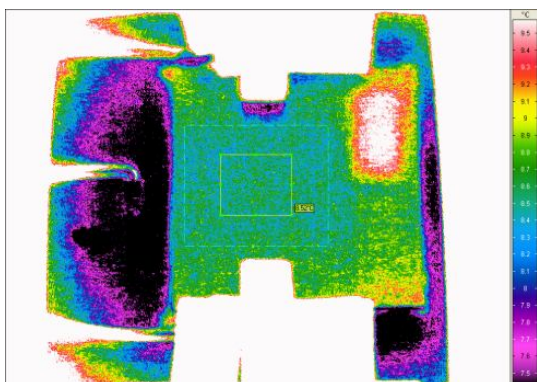
Obr. 4 Při teplotě 4°C



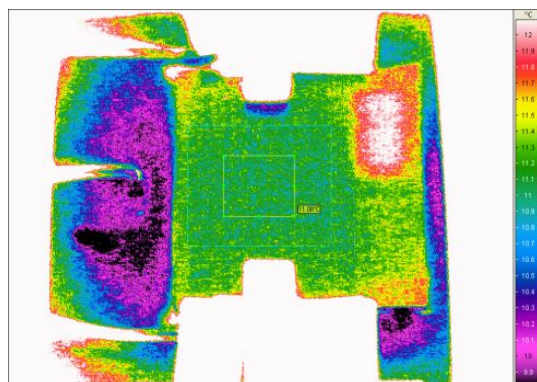
Obr. 5 Při teplotě 6°C



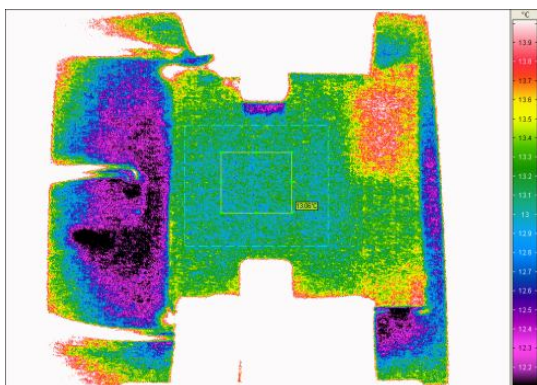
Obr. 6 Při teplotě 8°C



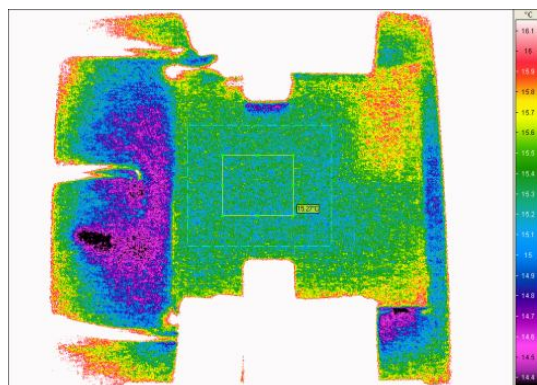
Obr. 7 Při teplotě 10°C



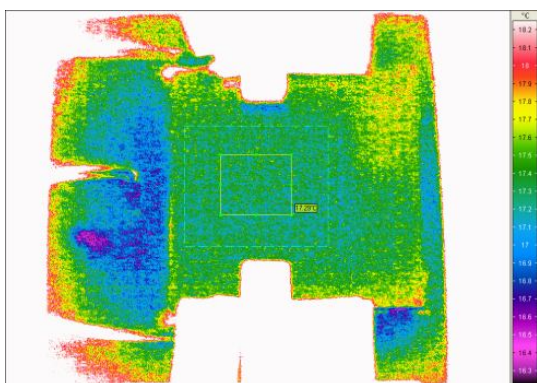
Obr. 8 Při teplotě 12°C



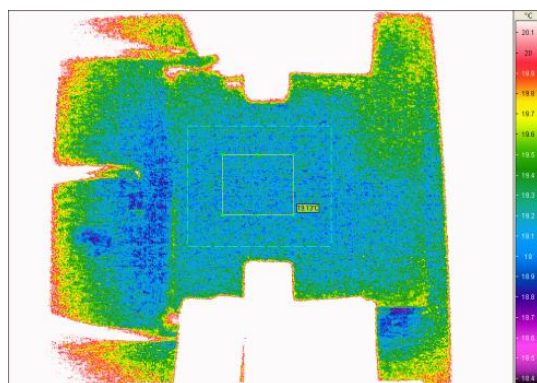
Obr. 9 Při teplotě 14°C



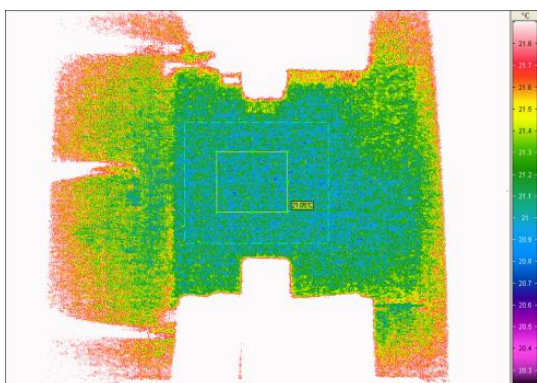
Obr. 10 Při teplotě 16°C



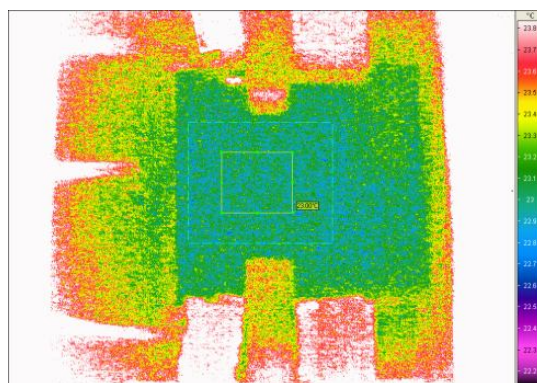
Obr. 11 Při teplotě 18°C



Obr. 12 Při teplotě 20°C



Obr. 13 Při teplotě 22°C

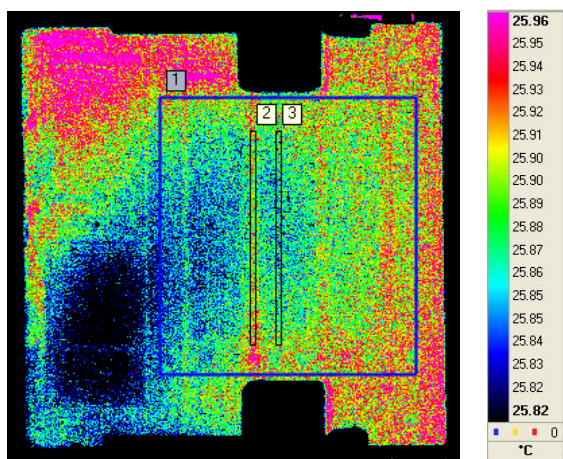


Obr. 14 Při teplotě 24°C

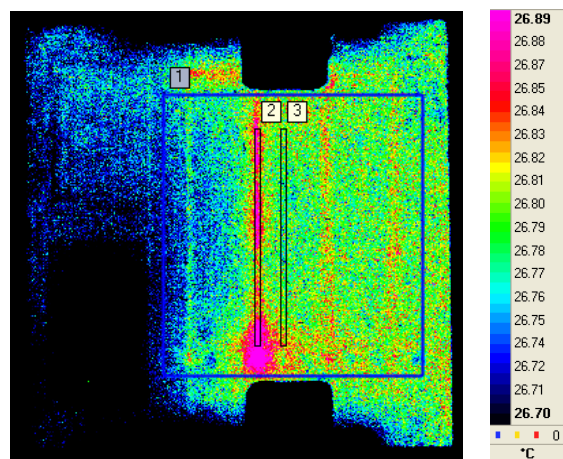


Příloha 7

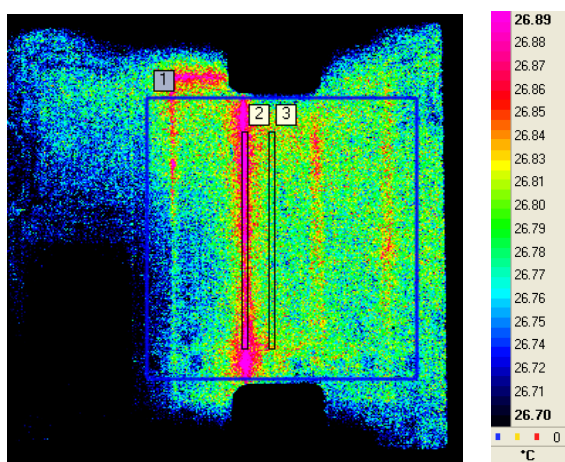
**Měření rozložení teploty a vlivu chlazení provedené
v průběhu elektroforetického procesu**



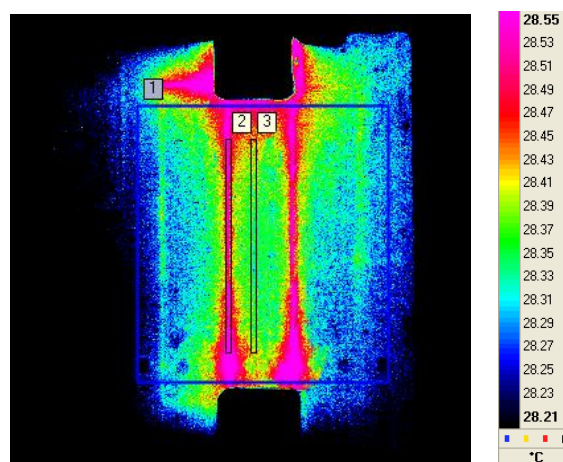
Obr. 1 Přivedené napětí 1000V



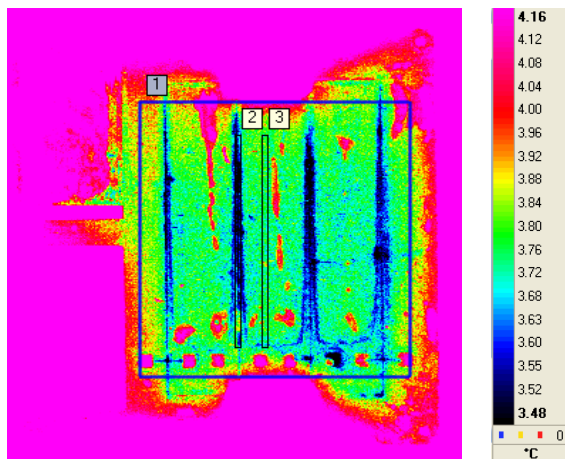
Obr. 2 Přivedené napětí 1500V



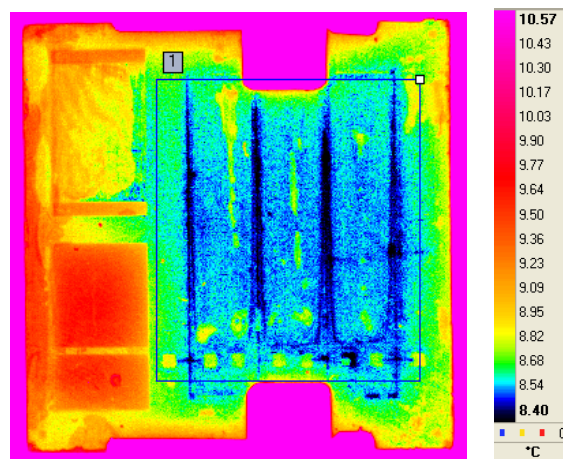
Obr. 3 Přivedené napětí 2000V



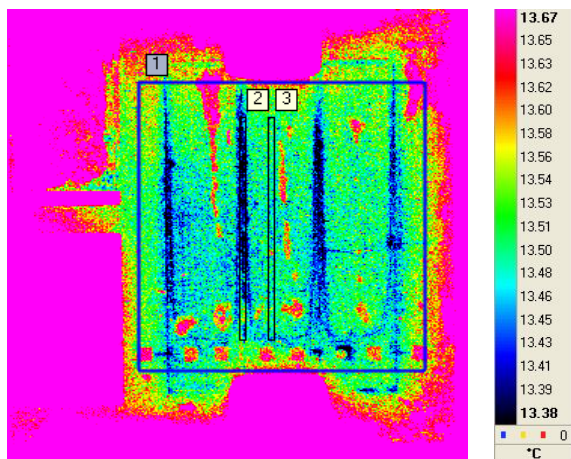
Obr. 4 Přivedené napětí 2500V



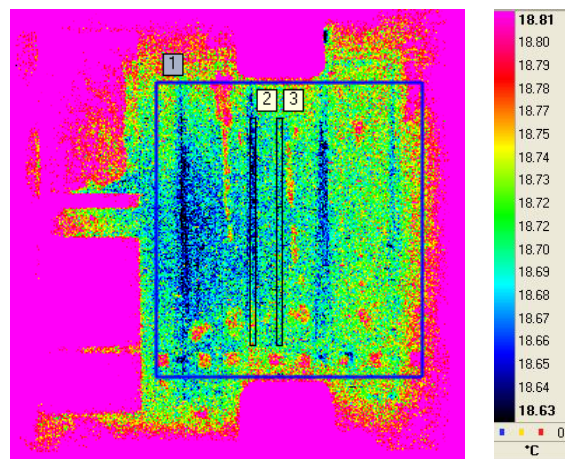
Obr. 5 Přivedeno napětí 1000V se
současným chlazením na 5°C



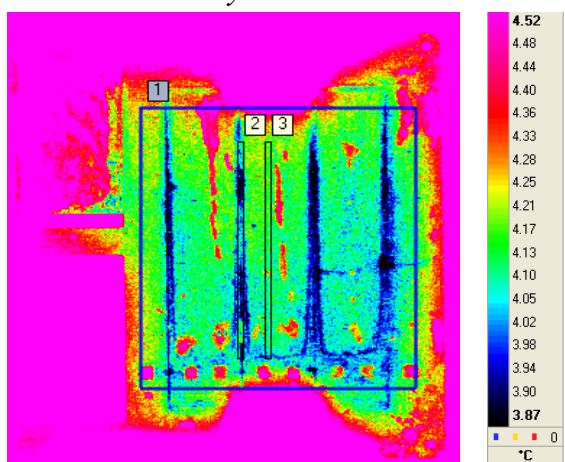
Obr. 6 Přivedeno napětí 1000V
se současným chlazením na 10°C



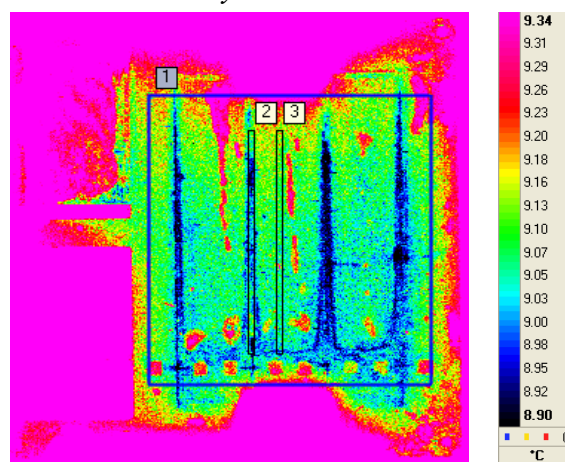
Obr. 7 Přivedeno napětí 1000V
se současným chlazením na 15°C



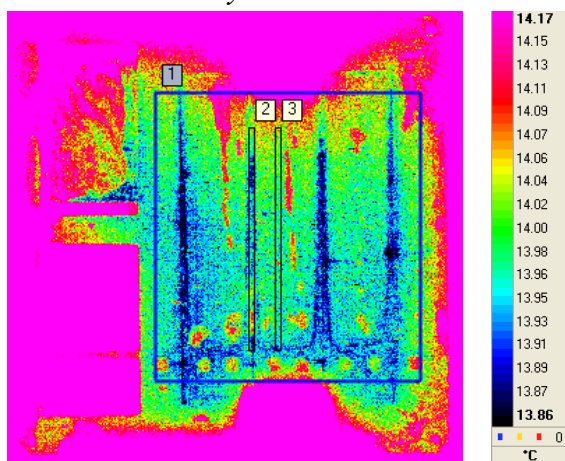
Obr. 8 Přivedeno napětí 1000V
se současným chlazením na 20°C



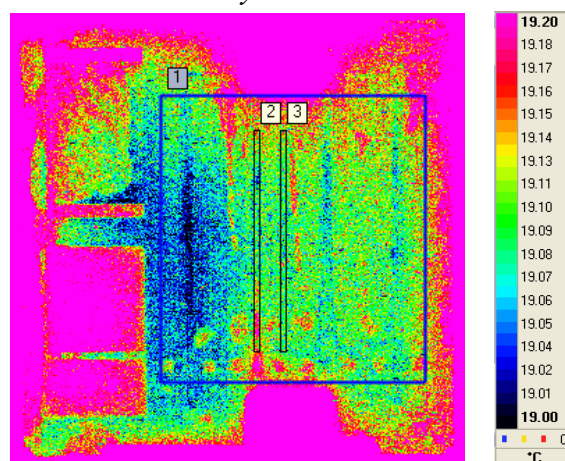
Obr. 9 Přivedeno napětí 1500V
se současným chlazením na 5°C



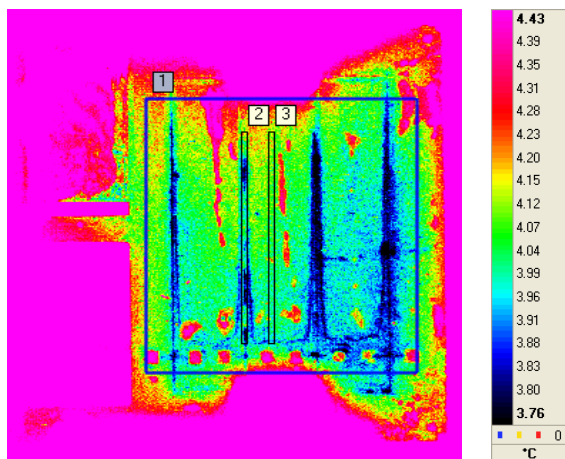
Obr. 10 Přivedeno napětí 1500V
se současným chlazením na 10°C



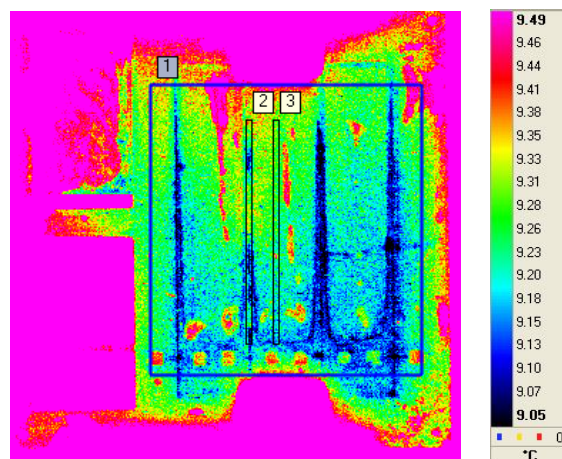
Obr. 11 Přivedeno napětí 1500V
se současným chlazením na 15°C



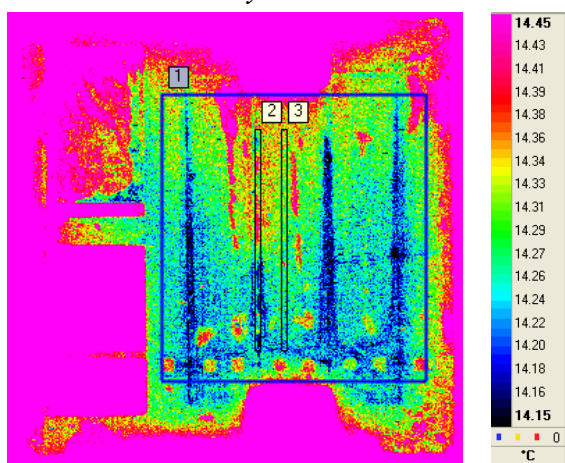
Obr. 12 Přivedeno napětí 1500V
se současným chlazením na 20°C



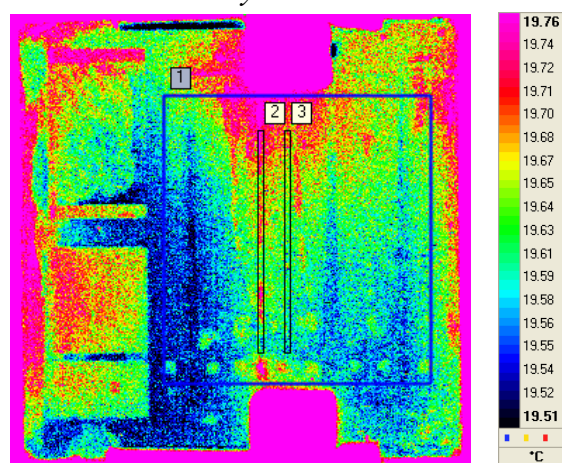
Obr. 13 Přivedeno napětí 2000V
se současným chlazením na 5°C



Obr. 14 Přivedeno napětí 2000V
se současným chlazením na 10°C



Obr. 15 Přivedeno napětí 2000V
se současným chlazením na 15°C



Obr. 16 Přivedeno napětí 2000V
se současným chlazením na 20°C